

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 48/00</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/21589</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)</p>								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06849</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">197 47 718.6</td> <td style="width: 30%;">29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td style="width: 40%;">DE</td> </tr> <tr> <td>197 47 719.4</td> <td>29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: BALTZER, Axel, Wilhelm, August [DE/DE]; Am Strickmorgen 12, D-41464 Neuss (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LATTERMANN, Christian [DE/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). WHALEN, Janey, Desales [US/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). ROBBINS, Paul, David [US/US]; 191 Main Entrance Drive, Pittsburgh, PA 15228 (US). EVANS, Christopher, Howard [GB/US]; 111 Maple Terrace, Pittsburgh, PA 15211 (US).</p> <p>(74) Anwalt: SIECKMANN, Ralf; Schumannstrasse 97-99, D-40237 Düsseldorf (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06849</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">197 47 718.6</td> <td style="width: 30%;">29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td style="width: 40%;">DE</td> </tr> <tr> <td>197 47 719.4</td> <td>29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: BALTZER, Axel, Wilhelm, August [DE/DE]; Am Strickmorgen 12, D-41464 Neuss (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LATTERMANN, Christian [DE/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). WHALEN, Janey, Desales [US/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). ROBBINS, Paul, David [US/US]; 191 Main Entrance Drive, Pittsburgh, PA 15228 (US). EVANS, Christopher, Howard [GB/US]; 111 Maple Terrace, Pittsburgh, PA 15211 (US).</p> <p>(74) Anwalt: SIECKMANN, Ralf; Schumannstrasse 97-99, D-40237 Düsseldorf (DE).</p>	197 47 718.6	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE	197 47 719.4	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06849</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">197 47 718.6</td> <td style="width: 30%;">29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td style="width: 40%;">DE</td> </tr> <tr> <td>197 47 719.4</td> <td>29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: BALTZER, Axel, Wilhelm, August [DE/DE]; Am Strickmorgen 12, D-41464 Neuss (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LATTERMANN, Christian [DE/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). WHALEN, Janey, Desales [US/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). ROBBINS, Paul, David [US/US]; 191 Main Entrance Drive, Pittsburgh, PA 15228 (US). EVANS, Christopher, Howard [GB/US]; 111 Maple Terrace, Pittsburgh, PA 15211 (US).</p> <p>(74) Anwalt: SIECKMANN, Ralf; Schumannstrasse 97-99, D-40237 Düsseldorf (DE).</p>	197 47 718.6	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE	197 47 719.4	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
197 47 718.6	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE								
197 47 719.4	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE								
<p>(54) Title: USE OF VECTORS SUCH AS ADENOVIRUSES AND/OR ADENO ASSOCIATED VIRUSES AND/OR RETROVIRUSES AND/OR HERPES SIMPLEX VIRUSES AND/OR LIPOSOMES AND/OR PLASMIDS AS A VEHICLE FOR GENETIC INFORMATION ENABLING MAMMAL CELLS TO PRODUCE AGENTS FOR THE TREATMENT OF BONE PATHOLOGIES</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON VEKTOREN WIE ADENOVIREN UND/ODER ADENO-ASSOZIIERTEN VIREN UND/ODER RETROVIREN UND/ODER HERPES-SIMPLEX-VIREN UND/ODER LIPOSOMEN UND/ODER PLASMIDEN ALS VEHIKEL FÜR GENETISCHE INFORMATION ZUR BEFÄHIGUNG VON SÄUGETIERZELLEN MITTEL, ZUR BEHANDLUNG VON KNOCHENPATHOLOGIEN ZU PRODUZIEREN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Disclosed is the use of vectors such as adenoviruses and/or adeno associated viruses and/or retroviruses and/or Herpes Simplex viruses and/or liposomes and/or plasmids as agents which stimulate mammal cells in order to produce therapeutic proteins that act as medicaments on a cellular level for the genetic treatment of bone pathologies.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Offenbart wird die Verwendung von Vektoren wie Adenoviren und/oder Adeno-assoziierten Viren und/oder Retroviren und/oder Herpes-Simplex-Viren und/oder Liposomen und/oder Plasmiden als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen, als Arzneimittel wirkenden Proteinen auf zellulärem Niveau zur genetischen Behandlung von Knochenpathologien.</p>										

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von Vektoren wie Adenoviren und/oder Adeno-assoziierten Viren und/oder Retroviren und/oder Herpes Simplex Viren und/oder Liposomen und/oder Plasmiden als Vehikel für genetische Information zur Befähigung von Säugetierzellen Mittel zur Behandlung von Knochenpathologien zu produzieren.

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Adenoviren und/oder Adeno-assoziierten Viren und/oder Retroviren und/oder Herpes Simplex Viren und/oder Liposomen und/oder Plasmiden als Vektoren, respective Vehikel für genetische Information, um Säugetierzellen auf genetischem Wege zu befähigen therapeutische, als Arzneimittel wirksame Proteine zur Korrektur von Knochenpathologien, auf zellulärer Ebene, herzustellen.

Bei Adenoviren handelt es sich um einfache, aus Doppelstrang DNA und Proteinen aufgebaute DNA-Viren, von den einige humanpatogen sind, Infektionen des Auges und des Respirationstraktes verursachen. Viele Arten induzieren Tumore in Versuchstieren, die nicht dem natürlichen Wirt entsprechen oder können Zellen *in vitro* transformieren. Adenovirale Vektoren sind veränderte Adenoviren, die die Fähigkeit zur Replikation *in vivo* und ihre typische Pathogenität eingebüßt haben.

Auch das Adeno-assoziierte Virus ist als solches bekannt und wird beispielsweise zur Markierung von Zellen eingesetzt, wie in der WO 95/14232 näher beschrieben.

Unter Retroviren im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man RNA Viren der Klasse 6, die einsträngige Ribonukleinsäure (RNA) und das Enzym reverse Transkriptase enthalten. Mit Hilfe dieses Enzyms wird die in die Wirtszelle gelangene RNA in DNA übersetzt, um mitsamt zusätzlicher repetitiver Sequenzen anschließend

BESTÄTIGUNGSKOPIE

- 2 -

in das Wirtsgenom integriert und als sogenanntes Provirus mit ihm repliziert zu werden. Retroviren, die als Vektoren in der Gentechnologie eingesetzt werden, sind replikationsdefizient und apathogen bezüglich ihrer typischen Pathogenität.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein genetisches Behandlungsverfahren für im einzelnen weiter unten aufgeführte Knochenpathologien bereitzustellen, welches ein spezielles Mittel beinhaltet, um Säugetierzellen zur Herstellung von therapeutischen Proteinen zu befähigen. Die Übertragung der genetischen Information wird durch spezielle Vektoren ermöglicht.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung von Vektoren wie Adenoviren und/oder Adeno-assoziierten Viren und/oder Retroviren und/oder Herpes-Simplex Viren und/oder Liposomen und/oder Plasmiden als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen, als Arzneimittel wirkenden Proteinen auf zellulärem Niveau, zur Behandlung von Knochenpathologien.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den Adenoviren um adenovirale Vektoren. Dies sind von den derzeit über 40 bekannten humanen Adenovirentypen, wie beispielsweise Ad2 und Ad5, die, zum Vektor transformiert, erfindungsgemäß eingesetzt werden können. Diese werden dahingehend verändert, daß sie ihre Fähigkeit zur Replikation *in vivo* und ihre Pathogenität dadurch einbüßen, daß die essentielle E-1-Sequenz entfernt worden ist. Anstelle der E1-Sequenz und der nicht essentiellen E3-Sequenz wird bei adenoviralen Vektoren die cDNA eingebaut, die für die therapeutischen Gene und Markergene kodiert. Die cDNA wird bei Eindringen des Virus in die Zelle im Nucleus episomal abgelagert. Über den gängigen Protein-Synthese-Apparat der Zellen werden dann die kodierten Substanzen produziert und exprimiert.

Nach einer anderen besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den Adeno-assoziierten Viren um ein Adeno-assoziierte virale Vektoren. Beispiele hierfür sind das adenoassoziierte Virus vom Wildtyp, welches im Journal of Virology Februar 1983, Vol. 45, S. 555-564, insbesondere Fig. 1 bis 4 und

den Abschnitten Materials and Methods und Results, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird, beschrieben ist.

Rekombinante Retroviren, die zur Zeit als Vektoren in humanen Gentherapie-Versuchen benutzt werden stammen sämtlich vom Wild-Typ des Moloney Murinen Leukämie (MoMuLV) Retrovirus ab. Die rekombinanten Viren sind strukturell mit dem Wild-Typ des Retrovirus identisch, tragen aber ein genetisch verändertes Genom, das für die therapeutischen Gene, bzw. die Markergene kodiert. Rekombinante Retroviren können sich in vivo nicht mehr selbst replizieren, sind jedoch noch infektiös und integrieren das Genom in die DNA der Zielzellen. Die pathogenen viralen Gene sind komplett entfernt.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Vektoren um Herpes-Simplex Virus Vektoren. Dies sind neurotrope humane Viren, die auch reife Neuronen befallen, und als Wildtyp-Virus eine Infektion vom latenten Typ verursachen können. Als virale Vektoren werden beispielsweise das Herpes Simplex Virus -1 in einer replikationsdefizienten, apathogen Form genutzt. Ein besonderer Vorteil des Herpes Simplex Virus Vektors ist es, auch besonders große fremde cDNA-Fragmente zu integrieren.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den Liposomen um liposomale Vektoren, die die genetische Information für Wachstumsfaktoren oder Zytokine, bzw. deren Inhibitoren enthalten und auf Säugetierzellen übertragen können. Es wird bezüglich der liposomalen Vektoren auf die Veröffentlichung von Gao und Huang in Biochem Biophys Res Commun 179:280 bis 285, 1991 verwiesen.

Nach einer anderen besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den Plasmiden um solche, die die genetische Information für Wachstumsfaktoren oder Zytokine, bzw. deren Inhibitoren enthalten und auf Säugetierzellen übertragen können. Es wird bezüglich als Vektoren benutzten Plasmide auf die Veröffentlichung von Smith, Shepherd, et al. in Gene Therapy 3:190 bis 200, 1996 verwiesen.

Bei dem erfindungsgemäß beschriebenen Verfahren werden auf zellulärem Niveau therapeutische Proteine erzeugt, bei denen es sich um Wachstumshormone, Zytokine oder Zytokininhibitoren handelt. Hier sind beispielhaft genannt: Transforming growth factor- β (TGF- β) z.B. TGF- β 1-5, Bone morphogenetic proteins (BMP) z.B. BMP-2-7, respektive osteogenic protein-1 (OP-1) z.B. OP- 1, Insulin like growth factor (IGF) z.B. IGF-1 und -2, fibroblast growth factor (FGF) z.B. FGF-1 und -2, Platelet derived growth factor (PDGF), Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF) zum Beispiel TNF- β oder TNF- α , Interleukin-6-inhibitoren, Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)-Inhibitoren, Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)-Inhibitoren, Interleukine wie Interleukin-4, Interleukin-10 und Interleukin-13.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den Säugetierzellen um tierische oder menschliche Zellen, insbesondere Knochenzellen, Knochenmarkszellen, Bindegewebszellen und/oder Muskelzellen.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Vektoren, die zur Produktion der Arzneimittel durch die transfizierten Zellen führen, parenteral appliziert.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Vektoren, die zur Produktion der Arzneimittel durch die transfizierten Zellen führen, intraossär appliziert.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Vektoren, die zur Produktion der Arzneimittel durch die transfizierten Zellen führen, lokal an den Ort der Knochenpathologie appliziert.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, im nachfolgenden *ex vivo* Verfahren genannt, werden zur weiteren Behandlung Säugetierzellen dem Körper entnommen, dann *in vitro* mittels der vorgenannten Vektoren transduziert, in einem geeigneten Medium kultiviert und autolog reimplantiert, wonach am Ort der Knochenpathologie diese Säugetierzellen die als Arzneimittel wirksamen, therapeutischen Proteine produzieren.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den Knochenpathologien um Osteoporose, lokalen oder systemischen Knochenmasseverlust, Knochensubstanzverlust oder Knochenstrukturstörungen, Knochenbrüche mit Knochensubstanzverlust, Defektfrakturen, oder Pseudarthrosen, Knochendefektzustände nach Operationen, Morbus Sudek, Knochensubstanzverlust bei Endoprothesenlockerungen, periartikuläre Osteolysen bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises z.B. bei der rheumatoiden Arthritis und/oder Osteonekrosen.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann als Knochenpathologie auch das Einheilen von Transplantaten, insbesondere ligamentärer, knöchernen oder tendinösen Transplantaten eingesetzt, z.B. in der Knie- und Schulterchirurgie, beschleunigt werden.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird zur Verbesserung des Knochenaufbaus die genetische Information (cDNA) der therapeutisch wirksamen Proteine Bone Morphogenetic Proteins 2 - 7 (BMP 2 - 7), Transforming growth factor- β (TGF- β), Fibroblast growth factors (FGFs), Insulin-like growth factors (IGFs), Platelet derived growth factors (PDGFs), sowie Vascular Endothelial growth factor (VEGF) verwandt, oder die cDNA von Zytokinen oder Zytokininhibitoren, z.B. Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Protein (IL-1Ra) oder Tumor Nekrosis Faktor- α (TNF- α)-Inhibitoren.

Nach einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird zur Reduktion des Knochenabbaus die genetische Information (cDNA) zur Bildung von Zytokininhibitoren, z. B. Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra) und sTNF α R (löslichem Tumor Nekrose Faktor α Rezeptor) und Interleukin-6-Inhibitoren oder resorptionshemmende Zytokine wie Interleukin-10, eingesetzt.

Die vorliegende Erfindung wird nun durch Figuren näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1 eine Auftragung der Produktion des therapeutischen Proteins IL-1Ra pro 50.000 Zellen nach 48 h [in pg] für mit MFG transduzierten osteoblastäre Zellen (Proben 1 – 6, Werte von durchschnittlich 9111,5 pg) gegenüber nicht transduzierten osteoblastären Zellen (Kontrolle 1a – 3a, Werte um 0 pg) und retroviralen LacZ transduzierten osteoblastären Zellen (Kontrolle 1b – 3b, Werte um 0 pg). Die Messung erfolgte durch ELISA Analyse.

Fig. 2 eine Auftragung der spontanen Produktion von Alkalischer Phosphatase (ALP) durch humane osteoblastäre Zellen (HOB) (9,5 Units pro 1.000.000 Zellen), ebenso wie die positiven Kontrollen, die mit murinen Osteogenensis imperfecta Stammzellen (OIM) nach Stimulation mit BMP-2 (30 Units pro 1.000.000 Zellen) durchgeführt wurden. Die Negativ-Kontrollen mit immortalisierten synovialen Fibroblasten (HIG-82) produzieren keine Alkalische Phosphatase. Auch im azellulären Nährmedium (keine Zellen = no cells) ist keine ALP vorhanden.

Fig. 3 eine Auftragung der Abnahme des Trockengewichtes der Humeri, Tibiae und Fibulae in mg bei weißen Balb/C Mäusen durch eine Ovariectomie (OVX) 12 Tage postoperativ, im Vergleich zu simuliert operierten Mäusen (sham). Durch intraossäre Applikation von 10^9 pfu Ad-IL-1Ra (OVX-IL-1Ra) ließ sich der Knochenmasseverlust im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (OVX-LacZ) um etwa 50% reduzieren.

Fig. 4 eine Auftragung der Expression des Markerenzym Luciferase [Units/g] in der weißen Balb/C Maus im Knochengewebe, Muskelgewebe, Lymphknotengewebe, sowie leicht und transient auch in der Leber, nach intraossär/intramuskulärer Transduktion der Femora mit 10^9 pfu Ad-Luc. Lunge und Milz werden von den adenoviralen Vektoren offenbar nicht erreicht und zeigen keine Enzym-Expression. In Knochen und Muskulatur dauert die Enzymexpression für den gesamten

Untersuchungszeitraum von 21 Tagen an, in der Leber ist eine Expression nur für die Dauer von fünf Tagen feststellbar, in den drainierenden Leistenlymphknoten für die Dauer von 14 Tagen. Es kann somit außerhalb des Applikationsbereiches eine geringe und zeitlich stark limitierte Transgen-Expression angenommen werden.

Fig. 5 den systemischen Nachweis von transgenem IRAP (Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Protein) über einen Verlauf von 12 Tagen in weißen Balb/C Mäusen, um die Güte verschiedener Applikationsformen von Ad-IL-1Ra, bei systemischen Knochenerkrankungen zu testen. Nach intrafemoraler Applikation (♦) von 10^9 pfu Ad-IL-1Ra finden sich positive systemische IRAP-Spiegel für die gesamte Untersuchungsdauer von 12 Tagen mit maximalen Werten am 3. Tag von nahezu 100 pg/ml. Im Gegensatz dazu werden durch intravenöse Gabe von Ad-IL-1Ra (●) geringere Werte bis zu 32 pg/ml, bei einer maximalen Expressionsdauer von 3 Tagen erreicht. In der Negativ-Kontrolle, die mit 10^9 pfu des nicht therapeutischen Markergens Ad-LacZ (▲) durchgeführt wurde konnte systemisch kein Nachweis für transgene IL-1Ra Spiegel geführt werden.

Fig. 6 die im Urin ausgeschiedene Menge an Desoxypyridinoline-Crosslinks [nM]_{24h} nach Ovariectomie (OVX) bzw. simulierter Ovariectomie (sham) bei weißen Balb/C Mäusen. Es wird deutlich, daß nach Ovariectomie mehr Desoxypyridinoline-Crosslinks im Urin ausgeschieden werden, die als direkter osteoklastärer Aktivitätsparameter gelten.

Fig. 7 eine 50-fach vergrößerte Ansicht eines Paraffinschnittes der intrafemorale Cavität von Balb/C Mäusen nach intraossärer Transduktion mit 10^9 pfu adenoviraler Vektoren, die für LacZ (β-Galaktosidase) kodieren. Morphologisch sind vor vor allem ruhende Osteoblasten (lining osteoblasts) aber auch Knochenmarkzellen transduziert. Diese Zellen sind mittels Pfeilen markiert.

Fig. 8 eine Auftragung der Expression des transgenen Enzyms Luciferase [Units/ μ l] nach Injektion von 10^{10} pfu Ad-Luc in den femoralen Defekt beim weißen Neuseeland Hasen. Das Verteilungsmuster der Enzymaktivität verdeutlicht, daß nach lokaler Vektoren-Applikation in den Knochendefekt die Expression der Transgene offenbar hauptsächlich aus lokalen Gewebestrukturen erfolgt. Knochen, Defekt-/Narbengewebe und Muskulatur exprimieren das Transgen mit hohen Expressionswerten (bis zu 70.000 Units/100 μ l im Muskel). Kein Nachweis einer Transgenaktivität findet sich in der Lunge, der Milz und in contralateralen, muskuloskelettären Gewebeproben (nicht graphisch dargestellt). Lediglich in der Leber läßt sich eine transiente, schwache Transgenaktivität für 5 Tage nachweisen. Die Genexpression war im Knochen für insgesamt 42 Tage am längsten nachweisbar, im Defekt-füllenden Gewebe und in der Muskulatur war nach 15, bzw. 26 Tagen keine Genexpression mehr nachweisbar.

Fig. 9 eine 50-fache Vergrößerung eines entkalkten Paraffinschnittes aus dem Bereich des femoralen Defektes am weißen Neuseeland-Hasen. Morphologisch sind neben Bindegewebszellen auch Adipozyten und möglicherweise Stammzellen transduziert. Auch hier sind diese Zellen durch Pfeile markiert.

Fig.10 eine 20-fache Vergrößerung eines entkalkten Paraffinschnittes aus dem Bereich des Defektrandes beim femoralen Defektmodell am weißen Neuseeland-Hasen. Histomorphologisch sind neben ruhenden Osteoblasten, die durch Pfeile angedeutet sind, auch Bindegewebszellen der angrenzenden Narbe transduziert.

Fig. 11 exemplarisch anhand von drei Röntgenaufnahmen den Heilungsverlauf des femoralen Defektes beim weißen Neuseelandhasen, 5 Wochen nach intraläsionaler Transduktion mit 2×10^{10} pfu adenoviraler Vektoren, welche für BMP-2 kodieren. Deutlich ist in allen drei Fällen ein nahezu vollständige Füllung der Defektkammer mit mineralisierten Knochen zu erkennen.

Fig. 12 exemplarisch anhand von drei Röntgenaufnahmen den Heilungsverlauf des femoralen Defektes beim weißen Neuseelandhasen, 5 Wochen nach intraläsionaler Transduktion mit 2×10^{10} pfu adenoviraler Vektoren, welche für das nicht therapeutische Markergen Luciferase kodieren. Es sind deutliche ossäre Substanzdefekte in der Defektkammer zu sehen. Der Vergleich mit dem Heilungsverlauf nach Applikation therapeutischer Vektoren (Fig. 11) zeugt von einer guten Wirksamkeit des transgenen BMP-2.

Fig. 13 eine Produktion von humanen IL-1Ra Osteoblastzellen im Anschluß an eine *in vitro* Transduktion mit Ad-IRAP nach einer multiplicity of infection von 1000. Der höchste Grad an Expression wurde 3 Wochen nach der Transduktion gefunden. Die Genexpression war *in vitro* für 72 Tage nachweisbar.

Die vorliegende Erfindung wird nun weiterhin durch Ausführungsbeispiele näher erläutert, wobei Prozentangaben jeweils sich auf Gewichtsprozentangaben beziehen.

Anwendungsbeispiel 1:

In vitro Evaluation einer Osteoporose Therapie mit retroviralen Vektoren anhand humaner osteoblastärer Zellpopulationen.

Material und Methodik

Als Grundlage der Zellkulturen diente humaner spongiöser Knochen, der von informierten Patienten mit therapeutischer radialer oder ulnarer Resektionsosteotomie gewonnen wurde. Zellen mit arthrotischen, oft mit nekrotischen Veränderungen versehenen Hüftköpfen waren nur schwer zu kultivieren und hatten lediglich eine kurze Überlebenszeit *in vitro*.

Isolierung der Zellen

Nach Entfernung der kortikalen Anteile wurde der verbleibende spongiöse Knochen mit Stücken von etwa 1mm^3 zerteilt und nachfolgend in Kultur genommen.

Fragmente mit verbliebenen kortikalen Anteilen wurden über Nacht mit 0,1% Collagenase (Seromed, Berlin) in 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc, Dänemark) behandelt. Anschließend wurde die Collagenaselösung entfernt und die Spongiosafragmente 3 mal mit PBS (Seromed, Berlin) gewaschen. Die durch den Collagenaseverdau freigesetzten Bindegewebszellen wurden dadurch quantitativ entfernt. Die Knochenfragmente wurden anschließend in Nährmedium (RPMI Medium 1640 (CibcoBRL, Grand Island, NY, USA)) mit 10 % fetalem Kälber Serum (FBS) und 1 %iger Penicillin/Streptomycinlösung (CibcoBRL, Grand Island, NY, USA)) kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C unter 5 %iger Kohlendioxidbegasung. Nach etwa 16 bis 20 Tagen begannen die Zellen die Oberfläche der Spongiosa sowie den Boden der Kulturflaschen zu besiedeln. Die Zellen erreichten nach weiteren 3 Wochen Konfluenz und wurden nach Trypsinierung mit 2 ml Trypsin (Trypsin, 0,25 % (CibcoBRL, Grand Island, NY, USA)) mit den entsprechenden Analysen auf Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen aufgeteilt.

Produktion der Virus-Partikel

Die Produktions-Zelllinien für die retroviralen Partikel basieren auf einem Derivat der NIH3T3 Zelllinie (CRIP). Die Zelllinie enthält gentechnisch integrierte virale *env* und *gag* Gene. Diese erlauben die Produktion von retroviralen Viren aus den Proviren MFG-IRAP und BAG. MFG-IRAP und CRIP-BAG sind in der Publikation von G. Bandara et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10764 bis 10768 (1993) unter dem Titel Intraarticular expression of biologically active interleukin-1-receptor-antagonist protein by *ex vivo* gene transfer beschrieben. Beide Zelllinien produzieren amphotropische retrovirale Partikel, weisen also eine breite Wirtsspezifität auf. MFG-IRAP trägt die cDNA des humanen Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (hIL-1Ra).

BAG trägt das bakterielle β -Galaktosinase Gen (LacZ) und ein Neomycin Resistenz Gen (*neoR*), welches eine Selektion der transfizierten Zelle ermöglicht. Als Promotor für die hIL-1Ra-cDNA und LacZ dient der virale long terminal repeat (LTR). Die CRIP-Zellen werden in (DMEM)-Medium (CibcoBRL, Grand Island, NY, USA), 10 % FBS (CibcoBRL, Grand Island, NY, USA) und 1 % HEPES (CibcoBRL, Grand Island, NY, USA) im Inkubator bei 37 °C und 5 % Kohlendioxidbegasung kultiviert.

Der Virus enthaltende Überstand wurde täglich aus konfluenten Kulturen gesammelt. Nach Filtration durch einen 0,45 μ m feinen Spritzenfilter (Sartorius AG, Deutschland) wurde die Vektorensuspension bei -80 °C bis zur Benutzung aufbewahrt. MFG und

BAG stammen beide vom Moloney Murinen Leukämie Virus (MoMuLV, wie von P. Wehling et al. in Spine 21: 931-935 (1996) sowie S. Wells et al. in Gene Therapy 2: 512-520 (1995) beschrieben). MFG wurde als Vektor bereits in verschiedenen gentherapeutischen Versuchen eingesetzt, einschließlich einem humanen Phase-I Versuch bei der Rheumatoiden Arthritis. Beide Retroviren sind nicht mehr autonom replikationskompetent, das heißt, daß eine selbständige Vermehrung des Retrovirus *in vivo* nicht möglich ist.

Transduktion

Die osteoblastären Zellen wurden mittels Trypsin-Verdau aus den Zellkulturflaschen gelöst und in 12 well plates Zellkulturschalen mit 30.000 Zellen pro Schale ausgebracht. Nach Erreichen von etwa 80 % Konfluenz wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen zweimal mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Transduktion wurde mit 1 ml viralem Überstand bei einer Viruskonzentration von 1×10^6 Partikeln Retrovirus pro ml Virusüberstand durchgeführt und mit einem kationischen Polymer, das heißt einem Copolymeren aus N,N,N',N'-Tetramethyl-1,6-hexandiamin und 1,3-Dibrompropan von der Abbott-Corporation unter der Bezeichnung Polybrene®, welches unter anderem von Aldrich vertrieben wird als Promotor moduliert. Während der ersten Stunde der Transduktion wurden die Zellkulturschalen bei Raumtemperatur langsam zentrifugiert und bei etwa 500 RPM und dann über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Nährmedium ausgetauscht. Der Überstand der MFG-IRAP transduzierten Zellen wurde gesammelt und für spätere IL-1Ra-Quantifizierung bei -80°C eingefroren.

Nachweis der LacZ-Transfektion

48 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen fixiert und die LacZ-Expression mittels X-gal Färbung wie folgt präpariert. Die Zellen wurden zunächst mit 1 ml PBS-Lösung (Seromed, Deutschland) gewaschen, anschließend mit Lösung 1 (1 ml 0,5 %ige Gluturaldehyd in 49 ml PBS (Roth GmbH, Deutschland)) über 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nachfolgend wurden die Zellkulturschalen zweimal für je 10 min mit Lösung 2 (1 ml PBS-Lösung in 1mM Magnesiumchlorid) gewaschen. Danach wurde Lösung 2 durch die Substrat-Lösung (Lösung 3) bestehend aus 1500 µl 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 30 µl 1 M MgCl_2 , 750 µl 1mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-gal) und 27 ml PBS ausgetauscht und über Nacht in den Zellkulturschalen belassen. Am nächsten Morgen wurde Lösung 3

durch PBS ersetzt und die typischen Blaufärbungen der Zellen lichtmikroskopisch quantifiziert.

Quantifizierung der IL-1_{Ra} Expression

IL-1_{Ra} wurde durch einen kommerziellen ELISA-Kit (Biosource, USA) gemäß Herstellerinformationen bestimmt.

Bestimmung der Alkalischen Phosphatase

Die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) wurde bei den Zellkulturen in der ersten Passage durchgeführt. Immortalisierte synoviale Fibroblasten (HIG-82) dienten als negative Kontrollen; immortalisierte Knochmarksstammzellen von Osteogenesis imperfecta Mäusen (OIM), welche zuvor mit rekombinanten BMP-2 stimuliert wurden, dienten als positive Kontrollen. Alle Zellkulturen wurden einem dreimaligem Gefrier-Tau-Zyklus bei -80 °C unterworfen, um die Zellmembranen zu zerstören. Die geplatzten Zellen wurden dann bis zur weiteren Analyse bei einer Temperatur von -80 °C gelagert. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde mit einem kommerziellen Analyse Kit der Sigma Diagnostics (Dorset, United Kingdom) nach Herstellerangaben analysiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm nach 1, 2 und 30 min bestimmt an einem UV-Max Gerät der Firma Molecular Devices, USA.

Ergebnisse

X-gal Färbung

Die Transduktion von retro-LacZ wurde simultan in drei Zellkulturschalen durchgeführt. In allen Zellkulturschalen wurde durch die X-gal Färbung eine Blaufärbung von Zellen erreicht. Der Anteil transduzierter Zellen an der Gesamtzellzahl betrug gemäß lichtmikroskopischer Quantifizierung 60 %. Es wurde keine Selektion transduzierter Zellen durchgeführt.

Gen-Expression

In 6 Zellkulturschalen wurde eine Transduktion der Zellen mit retro-IRAP durchgeführt. Der Überstand aus allen 6 Zellen ergab in der Analyse mittel ELISA, daß die Zellpopulationen mit der cDNA für hIL-1_{Ra} transduziert und das Transgen

mit durchschnittlich 9111,5 pg pro 50.000 Zellen und 48 Stunden bei einer Standardabweichung von 522,4 pg exprimiert wurde. Die ELISA-Analyse des Überstandes der drei Kulturschalen mit nicht transduzierten Zellkulturen, soweit die Analyse des Überstandes der mit retroviralem LacZ transduzierten Zellen, ergaben negative Werte, wie Fig. 1 zeigt.

ASSAY für Alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase (ALP) ist einer der ersten Marker, der bereits durch unreife Osteoblasten und während des osteoblastären Reifungsprozesses synthetisiert wird. Die in diesem Versuch benutzten Zellpopulationen exprimierten spontan alkalische Phosphatase mit einem Mittelwert von 9,5 Units pro 1.000.000 Units bei einer Standardabweichung von 0,7 Units. Die als negative Kontrolle dienenden immortalisierten synovialen Fibroblasten (HIG-82) exprimierten keine ALP, im Gegensatz zu den BMP-2 stimulierten immortalisierten OIM-Zellen, die als positive Kontrollen dienten. Als Kontroll-Zellpopulationen wählte man OIM- und HIG-82-Zellen, da die Potenz der OIM-Zellen nach Stimulation mit rhBMP-2 ALP zu synthetisieren bekannt ist. Aufgrund ihrer Fähigkeit, ALP zu synthetisieren wurden die Zellen als osteoblastäre Zellpopulation eingestuft. Die Ergebnisse des ALP-Aktivitäts Tests werden in Fig. 2 dargestellt.

Anwendungsbeispiel 2:

Einsatz von adenoviralen Vektoren zur Entwicklung einer Therapie der Östrogenmangel-bedingten Osteoporose im Modell der Balb/C Maus

Die Grundlage dieser Versuche ist das bekannte Wissen, daß ein Östrogenmangel über eine systemische Erhöhung der Zytokine Interleukin-1 und TNFa zu einer Aktivierung von Osteoklasten führt, die durch eine gesteigerte ossäre Resorption einen generalisierten Knochenmasseverlust verursachen. Die Theorie hinter den Versuchen zur Evaluation einer Osteoporose-Therapie am Modell der Balb/C Maus ist, daß bekanntermaßen nach Ovariectomie ein generalisierter Knochenmasseverlust auftritt, der nach etwa zwei Wochen sein Maximum erreicht. Es soll versucht werden mittels Einsatz adenoviraler Vektoren, die für IL-1Ra kodieren den Knochenmasseverlust partiell zu verhindern. Ein solches genetisches

Verfahren zur Therapie des Östrogenmangel-bedingten Knochenmasseverlustes ist bislang weder beschrieben, noch experimentell evaluiert.

Alle Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Experimente einheitlich 6 Wochen alt. Es wurden insgesamt fünf verschiedene Versuchsreihen durchgeführt.

Erstens wurde die Ausscheidung von Desoxy-Pyridinoline Crosslinks im Urin nach Ovariectomie (OVX) und nach simulierter Ovariectomie (sham) nach 2 Tagen gemessen. Die Analyse der Crosslinks erfolgte mittels kommerziellem Kit der Firma Metra Biosystems, Inc. (CA, USA) gemäß den Herstellerangaben. Diese Versuchsreihe diente zur Evaluation der Ovariectomie-Wirkung auf die Knochenresorption und zur Testung der Eignung dieser Analyse zur Differenzierung des Knochenmasseverlustes nach Behandlung mit therapeutischen Vektoren.

Zweitens wurde mit adenoviralen Vektoren, die für das Markergen LacZ kodieren (Ad-LacZ) getestet, ob eine Transduktion von Knochen und Knochenmark durch adenovirale Vektoren überhaupt möglich ist. Die Applikation der Vektoren erfolgte intrafemoral, durch einen transcutanen, intercondylären Zugang, der es ermöglichte 100µl eine Suspension mit physiologischer Kochsalzlösung und 10^9 pfu Ad-LacZ intraossär zu applizieren. Kontrollen wurden mit Instillation physiologischen Kochsalzlösung ohne Vektoren durchgeführt. Die immunhistochemische Färbemethode (LacZ Färbung ist in diesen Antrag mehrfach beschrieben) ermöglicht die farbliche Darstellung der erfolgreich transduzierten Zellen durch intensive Blaufärbung der LacZ exprimierenden Zellen.

In einer dritten Versuchsreihe wurde am Modell der Balb/C Maus durch die Administration von adenoviralen Markern, die für das Marker-Enzym Luciferase kodieren die Dauer der Genexpression und die intracorporale Distribution der Vektoren nach intraossärer Vektoren-Applikation untersucht. Je drei Mäuse wurden am Tag 2, 14 und 21 nach der Vektoren-Applikation getötet und verschiedene Gewebetypen im Bereich der Injektion, sowie verschiedene innere Organe zur Analyse auf Expression des Transgens. Diese wurde photometrisch mit dem

Autolumat® LB953 der Firma Berthold, Deutschland, wie im Anwendungsbeispiel 3 beschrieben, auf Enzymaktivität der transgenen Luciferase durchgeführt.

Viertens wurde die in den Experimenten gängigerweise durchgeführte intraossäre Vektoren-Applikation mit der parenteralen Vektoren-Applikation verglichen, um die Dauer und Intensität systemischer Transgen-Level in beiden Verfahren zu untersuchen. Die intraossäre Applikation der Vektoren wurde wie vorbeschrieben intafemoral durchgeführt, während die parenterale Injektion in den bei Mäusen großzügig angelegten Sinus retroorbitalis erfolgte. Die systemischen IL-1Ra Spiegel wurden im Serum der Mäuse nach wiederholten Blutabnahmen aus dem Sinus retroorbitalis bestimmt. Die Blutabnahmen erfolgten vor der Vektoren-Applikation, sowie an den Tagen 1, 2, 3, 5, 9 und 12 nach Injektion der Vektoren. Die Analyse der IL-1Ra Spiegel erfolgte mittels kommerzieller ELISA-Kits nach den Angaben des Herstellers.

In einem fünften Schritt wurde der Effekt des adenoviral transferierten, therapeutisch wirksamen IL-1Ra auf den Ovariectomie-induzierten Knochenmasseverlust untersucht. Dazu wurden vier Gruppen mit je mindestens 8 Mäusen gebildet, wobei in zwei Gruppen eine Ovariectomie durchgeführt wurde und die Mäuse entweder den therapeutischen Vektor Ad-IL-1Ra oder den nicht-therapeutischen Markergen-Vektor Ad-LacZ erhielten. Auf gleiche Weise wurden die beiden verbleibenden Gruppen behandelt, jedoch wurde anstelle der Ovariectomie lediglich eine simulierte Operation (sham) durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch Messung des Gesamt-Trockengewichtes der nicht manipulierten Humeri, Tibiae und Fibulae um die systemische Wirkung der Vektoren-Applikation evaluieren zu können. Das Trockengewicht wurde nach Exartikulation und vollständigem Entfleischen der Knochen, sowie einer Behandlung der Knochen in einem 90%igen Aceton-Alkohol-Bad in mg gemessen.

Ergebnisse

Die Analyse der Ausscheidung der Desoxy-Pyridinoline-Crosslinks im Urin bestätigt, wie in Figur 6 demonstriert, daß es nach Ovariectomie zu einer Erhöhung der

osteoblastären Aktivität mit zunehmender Knochenresorption kommt. Das Ovariectomie-Modell an der Balb/C Maus ist offenbar für die Bestimmung des Knochenmasseverlustes und geeignet für die Evaluation einer genetischen Therapie der Östrogenmangel-bedingten Osteoporose.

Wie in der Figur 7 demonstriert, werden nach intraossärer Applikation von adenoviralen Vektoren eine Reihe unterschiedlicher Zelltypen erfolgreich transduziert (Pfeile). Nach immunhistochemischer X-gal Färbung, die eine Darstellung der Zellen ermöglicht, welche das Transgen exprimieren, werden überwiegend Osteoblasten transduziert, aber auch Zellen des Knochenmarkes. Da Osteoblasten unter der Einwirkung von geeigneten Wachstumsfaktoren eine Ausreifung zum Osteocyten durchlaufen, ist wegen der großen Stabilität und dem immunologisch privilegierten Sitz dieser Zellen mit einer verlängerten Expression von Transgenen zu rechnen.

Die Enzym-Aktivität der Luciferase nach intraossärer Vektoren-Applikation von Ad-Luc wird in Figur 4 dargestellt. Sie demonstrier, daß über den gesamten Verlauf des Untersuchungsintervalles von 21 Tagen die Transgen-Expression in Knochen und Muskulatur persistiert. Die Transgen-Expression aus Leber (2 Tage) und drainierenden Leistelymphknoten (14 Tage) ist transient und erreicht nicht die Höhe der Enzymaktivität im Bereich der Injektion.

Der Vergleich der, in diesen Versuchsreihen bevorzugt angewandten intrafemoralen Vektor-Applikation, mit einer intravenösen Vektor-Applikation wird in Figur 5 präsentiert. Die Figur zeigt, daß die intrafemorale Applikationsform der intravenösen Applikationsform sowohl in der Intensität der Expression von Transgenen, als auch in der Dauer der Expression überlegen ist.

Die Figur 3 demonstriert anhand der Trockengewichte [mg] der Humeri, Tibiae und Fibulae, daß sich der Ovariectomie-induzierte Knochenmasseverlust, hier als Gewicht mineralisierten Knochens ausgedrückt, durch eine genetische Therapie mit adenoviralen Vektoren, die für IL-1Ra kodieren um etwa 50% reduzieren läßt.

Anwendungsbeispiel 3:

Beschleunigung des Knochenwachstums durch Einsatz von adenoviralen Vektoren, welche für Wachstumsfaktoren kodieren, am Modell des weißen Neuseeland-Hasen.

Material und Methodik**Tiere:**

Weibliche weiße Neuseelandhasen mit einem Alter von mehr als 6 Monaten und einem Gewicht von 4,3 bis 5 kg wurden in der Studie eingesetzt. Bei allen Tieren wurden chirurgische Defekte in Oberschenkelknochen derart erstellt, daß diese ohne eine Behandlung nach 9 Wochen noch nicht heilten.

Chirurgisches Verfahren

Nach Einleiten einer allgemeinen Narkose mit Ketaminhydrochlorid (Ketaject®) (40 mg/kg/M) und Xylasin (Xyla-ject®) (3 mg/kg/M) i.m., wurden beide Oberschenkel des Hasens rasiert, mit Isopropyl-Alkohol desinfiziert und in einer sterilen Weise vorbereitet. Eine allgemeine Anästhesie wurde eingeleitet, unter Verwendung von Isofluran 0,8 bis 1,5 % (AErrane®) ergänzt, mit 50 bis 100 % Sauerstoff und 50 % Distickstoffoxid. Eine zusätzliche Lokalanästhesie mit 2 % Lidocain wurde eingesetzt, während das Periost von den Femora abgelöst wurde, da dieses Verfahren Bewegungen der Hasen selbst unter allgemeiner Anästhesie bewirkte. Es erfolgte eine longitudinale Präparation der Weichteile. Die gesamte Diaphyse der Femora wurde freipräpariert und die Periostschicht vollständig entfernt. Eine 7 Loch DCP-Platte (Firma Synthes, Colorado, USA) wurde dann über den lateralen Femora platziert und mit selbstschneidenden 2,7 mm Schrauben fixiert. Ein exakter Defekt von 1,3 cm wurde mittels einer Kugelfräse erzeugt. Um die Osteosynthese von den enormen Biegekräften beim „Kicken“ der Hasen postoperativ zu schützen, wurden 3 Cerclage-Drähte benutzt, um eine zusätzliche Fixierung über der Platte an den distalen und proximalen Enden der Femora zu bewirken. Um Knochenfragmente und Knochenmarksanteile vollständig zu entfernen, wurde mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Durch Refixation der Muskulatur um den femoralen Defekt wurde eine Defekt-Kammer geschaffen. Alle Weichteilschichten wurden peinlich genau geschlossen und die Haut intrakutan vernäht. Kein weiteres Schienen oder Gipsen war notwendig.

Vektoren

Für die Transduktion der Zellen wurden rekombinante Adenoviren der ersten Generation (E1', E3') deletär benutzt, von denen einer das LacZ-Gen (Ad-LacZ) und der andere das Luciferase-Gen trug (Ad-Luc). In jedem Fall wurde die Genexpression durch einen humanen early promoter angeregt. Bei jedem Defekt wurden 0,5 ml einer Suspension von 1×10^{10} particles von adenoviralen Vektoren, entweder in Suspension mit einer physiologischer Kochsalzlösung oder mit gereinigtem Kollagengel (Vitrogen® Collagen Corporation, Palo Alto, Californien, USA) injiziert. Die kontralateralen femoralen Defekte erhielten entweder 0,5 ml einer physiologischen Kochsalzlösung oder 0,5 ml Kollagengel ohne Viruspartikel.

Zur Herstellung der Vektoren Ad-LacZ und Ad-Luc wurden 293-Zellen propagiert. Dieses Verfahren wird von Graham et al. in J. Gen Virol 36:59-72 (1977) beschrieben. Die 293-Zellen werden jeweils für 2 Stunden mit einer multiplicity of infection (m.o.i.) von 10 mit Adenoviren transfiziert. Die Zellen werden geerntet, nachdem sie 36 bis 48 Stunden nach der Infektion abgekratzt und in 5 ml einer 50 mM Tris-Cl (pH 7,5) und 200 mM Natriumchlorid resuspendiert werden. Nach 5-Frier-Tau-Zyklen wurden die Viren mittels 2 Cäsiumchlorid-Schritt-Gradienten (4 °C, 30.000 rpm, 1 Stunde) gereinigt. Ad-LacZ wurde gegen 10 % Glyzerindialysepuffer (100 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris-Cl, pH 7,5; 1 mM Magnesiumchlorid, 10 % v/v Glyzerin) dialysiert, wie von Mittereder et al. im J. Virol 70:7498-7509 (1996) beschrieben und Ad-Luc wurde gegen 3 % Saccarosedialysepuffer (150 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris-Cl, pH 7,5; 10 mM Magnesiumchlorid, 3 % v/v Saccarose) dialysiert. Jeder der Vektoren wurde durch seine optische Dichte bei 260 nm titriert. Beide Viren wurden aufbewahrt bis zum Einsatz bei einer Konzentration von 7×10^{12} Partikeln pro ml bei -80 °C.

Gruppen, Datensammlung und Analyse

Gruppe 1: Der femorale Defekt wurde bei 4 Hasen erzeugt, die mit 0,5 %iger physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurden, die 1×10^{10} Partikel Ad-LacZ enthielt. Zwei Hasen wurden nach zwei Tagen getötet, zwei weitere Hasen wurden 12 Tage nach der Operation getötet.

Gruppe 2: Vier Hasen wurden mit einem 0,5 ml einer Mischung von Kollagengel (Vitrogen[®]) mit 1×10^{10} Partikeln von Ad-LacZ behandelt. Die Hasen wurden gemäß dem Zeitplan von Gruppe 1 getötet.

Knochenmark, kortikaler und trabakulärer Knochen, Narbengewebe, welches den Defekt ausfüllt und Muskel, wurden auf Genexpression mittels der X-gal Färbung bei allen Hasen der Gruppe 1 und 2 analysiert. Um zu bestimmen, ob eine systemische Streuung der Vektoren stattgefunden hat, wurden Gewebe von der Milz, der Leber und Lunge entnommen, ebenso wie Knochen, Knochenmark und Muskel von den kontralateralen unbehandelten segmentalen Defekten. Alle Gewebeteile wurden in 10 % Formaldehydlösung für 24 Stunden fixiert, dann in 20 % EDTA dekalzifiziert, innerhalb von 2 bis 3 Wochen bei einem wöchentlichen Austausch des EDTA. Nach Einbetten des demineralisierten Gewebes in Paraffin wurden Blöcke geschnitten und die Gewebeabschnitte mit X-gal und Eosin angefärbt. Die transduzierten Zellen wurden histomorphologisch durch einen unabhängigen Pathologen beurteilt.

Gruppe 3: Acht Hasen der Gruppe 3 wurden mit 0,5 ml einer Mischung von physiologischer Kochsalzlösung mit 1×10^{10} Partikeln von Ad-Luc behandelt. Die Hasen wurden 2, 5, 10 und 14 Tage nach der Operation eingeschläfert. Es wurden Gewebeproben vom trabekulären und kortikalen Knochen, der die Defekt-Kammer umgab, vom Bindegewebe, das die Defekt-Kammer ausfüllte und vom Muskel, der den femoralen Defekt umgab, entnommen. Um eine systemische Distribution der Vektoren zu überprüfen, wurden Proben von Lunge, Leber und Milz ebenso analysiert wie muskulo-skelettäre Proben des nicht-transduzierten kontralateralen Defekts. Alle Gewebeproben wurden homogenisiert und nach Zugabe von 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung dreimal einem Frier-Tau-Zyklus unterzogen, um die Zellen zu zerstören. Die Zellen wurden dann bei -80°C aufbewahrt bis die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte. Nach dem letzten Auftauen wurden die Proben bei 10.000 rpm (5600 x g) für 5 Minuten zentrifugiert und die überstehende Lösung für die Messung der Luciferaseaktivität zurückgehalten. Die Luciferaseaktivität wurde bei Raumtemperatur mittels eines AutoLumat[®] LB953 der Firma Berthold, Deutschland gemäß den Hinweisen des Herstellers gemessen.

Erg bnis**X-gal Färbung**

Die histomorphologische Analyse zeigte, daß die Produktion von Ad-LacZ, welches entweder in physiologischer Kochsalzlösung oder in Kollagengel suspendiert war, zu einer lokalen Transduktion von Knochen, Knochenmark, Narbengewebe und Kallusgewebe führte sowie zu einer Transduktion des Muskels, welcher die Injektionsstelle umgab (Fig. 9 bis 10). Demgegenüber wurden keine LacZ⁺ Zellen in der Lunge, der Leber oder Milz oder in dem kontralateralen femoralen Defekt gefunden. Bei Verwendung von Kollagengel als Träger für den Adeno Virus zeigte die histologische Untersuchung des Defektes und des Narbengewebes, welches die Öffnung ausfüllte, selbst 12 Tage nach der Operation eine nicht-resorbierte feste Kollagenstruktur. Hieraus kann man nur schließen, daß das Adeno Virus durch das Gel verkapselt worden ist und deshalb keine Möglichkeit hatte zu transduzieren. Die histologische Analyse zeigte keinen Nachweis für eine lokale Entzündung.

Luciferase Assay

Ein verschieden hoher Gehalt an Luciferaseaktivität wurde im Knochen und im Knochenmark gefunden, ebenso wie im defekt-füllenden Bindegewebe, im umliegenden Muskelgewebe an der Injektionsstelle. 5 Tage nach der Transduktion war eine leichte Luciferaseaktivität in der Leber festzustellen, welche vollständig nach 10 Tagen verschwand. Keine Luciferaseaktivität konnte im kontralateralen Femur, der Lunge und der Milz gefunden werden (Fig. 8).

Radiologischer Heilungsverlauf nach Gabe therapeutischer Gene

Nachdem die Vorversuche, mit denen der Nachweis der Transduzierbarkeit der verschiedenen muskulo-skelettären Gewebestrukturen geführt und die Dauer der Expression von Transgenen bestimmt wurde, gezeigt hatten, daß das femorale Defektmodell am weißen Neuseelandhasen geeignet ist die Wirkung therapeutischer Gene auf die Defektheilung zu evaluieren, wurden nach dem gleichen Modell je vier und sechs Hasen mit 1×10^7 pfu Ad-TGF- β , bzw. 2×10^{10} pfu Ad-BMP-2 transduziert, simultan mit je vier bzw. fünf gleichaltrigen Kontrollhasen, die mit dem nicht-therapeutischen Markergen Ad-Luc transduziert wurden. Röntgenkontrollen erfolgten

nach der ersten Kontrolluntersuchung eine Woche postoperativ in zweiwöchentlichen Abständen. Wie in Figur 11 und 12 dargestellt war bereits nach 5 Wochen in der Ad-BMP-2 behandelten Gruppe ein deutlicher Mineralisationsvorsprung im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar. Die radiologische Abschlußuntersuchung in der 12. Woche ergab bei allen 6 Verum-Hasen eine gute knöcherne Durchbauung der femoralen Defektkammer, bei mangelhafter Durchbauung bis hin zur Pseudarthrose in der nichttherapierten Kontrollgruppe. Ein ähnlicher Trend war auch in der mit Ad-TGF- β therapierten Gruppe zu sehen. Der radiologische Heilungsverlauf zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich mehr mineralisierte Substanz in der femoralen Defektkammer, jedoch ohne die Ausildung einer radiologisch sichtbaren Ossifikation im Sinne einer cortico-trabekulären Ausreifung. Dieses Ergebnis blieb bis zur 16 postoperativen Woche unverändert.

Zusammenfassend ist zu schließen, daß Ad-BMP-2 eine stimulierende Wirkung auf die Ossifikation im femoralen Defekt hatte, Ad-TGF- β fördert vermutlich mehr eine unspezifische Mineralisation des Gewebes ohne zu einer letztendlichen Ausreifung des Knochens zu führen. Eine Kombination beider Vektoren könnte ggf. zu einer weiteren Beschleunigung der Knochenbruchheilung in Defektsituationen führen.

Biomechanik

12 Wochen nach Operation und Injektion der viralen Vektoren in den Defekt wurden die sechs mit Ad-BMP-2 behandelten Hasen (2×10^{10} pfu), sowie 5 Kontroll-Hasen, die lediglich 2×10^{10} pfu des Markergens Ad-Luc erhalten hatten getötet. Die operierten Femora wurden weitgehend entfleischt, unter Schonung aller auch ektoper Knochenbrücken. Dann erfolgte die vorsichtige Metallentfernung. Dabei zeigte sich, daß ein Femur der Kontrollgruppe in bindegewebiger Pseudoarthrose geheilt war, ein zweites Femur der Kontrollgruppe war lediglich eine so dünne Knochenbrücke auf, daß diese auch bei sehr vorsichtiger Präparation brach. Dieser Femur wurde daher aus der Auswertung ausgeschlossen. Nach Entfernung sämtlichen Metalls wurden die Präparate bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren.

Die biomechanische Analyse erfolgte im Drei-Punkte-Biege-Verfahren um die Biegesteifigkeit und die maximale Biegekraft der Femora zu bestimmen.

Die Femora wurden bis 24 Stunden vor den Tests gefroren gelagert und dann im Kühltank langsam aufgetaut. Jeder Femur wurde im Drei-Punkte-Biegungs-System platziert, das eine freie Biegestrecke von 4,5 cm gewährleistete. Die Lastaufnahme erfolgte in posterior-anteriorer Richtung, wobei die Last am Mittelpunkt der freien Biegestrecke übertragen wurde, die jeweils etwa den Mittelpunkt der Diaphysen darstellt.

Die Tests wurden mit dem Instron 8500 servo-hydraulic testing system (Instron Corp., Canton, MA) durchgeführt, es wurde ein Instron 2500 lbf Lastaufnahme Zelle verwandt. Die Deformation der Femora wurde mit dem internen LVDT-System gemessen. Die Daten wurden mittels Instron's MAX Software erhoben und mit Hilfe des Software-Programms MS-Excel analysiert.

Es wurde eine maximale Verbiegung von 1 cm angewandt, bei einer Beigerate von 0,5 cm/min. oder 0,0833 mm/sec. Bei Fraktur der Femora war der Test beendet.

Die mit Ad-BMP-2 behandelte Verumgruppe unterschied sich von der Kontrollgruppe signifikant ($p=0,036$) bezüglich der Steifigkeit und auch bezüglich der aufgewandten Kraft ($p=0,0055$).

Einzelmessungen:

Steifigkeit		Kraft	
Ad-BMP-2	Kontrolle	Ad-BMP-2	Kontrolle
75.6000	80.8000	195.0000	102.0000
118.0000	64.0000	131.6000	103.2000
99.6000	53.2000	171.2000	82.0000
79.6000	0.0000	227.6000	0.0000
97.6000		206.4000	
45.6000		92.4000	

Die biomechanische Analyse nach dem Drei-Punkte-Biegungsverfahren läßt darauf schließen, daß durch den Einsatz der adenoviralen Vektoren, die für BMP-2 kodieren und so auf zellulärem Niveau zu einer Produktion des als Arzneimittel wirksamen

Proteins führen, eine Beschleunigung der Knochen-Defektheilung erreicht werden kann.

Histomorphometrie

Wie in den vorbeschriebenen Versuchen wurde auch hier das femorale Defektmodell am weißen Neuseeland-Hasen genutzt. 16 Wochen nach der Operation der Tiere und nach Injektion 10^7 pfu adenoviraler Vektoren, deren cDNA für das potentiell therapeutische TGF-beta kodiert (Ad-TGF-beta) wurden die vier Tiere getötet und präpariert. Als Kontrollgruppe dienten 4 weiße Neuseelandhasen, die lediglich 10^7 pfu eines Markergens erhielten (Ad-Luc).

Die Bildanalyse wurde wie folgt am digitalisierten histologischen Schnitt vorgenommen. Die Bilder wurden mit einem 2-fachen Bandenfilter geschärft, um die blau gefärbten, knöchernen Areale zu definieren (Trichrome-Färbung). Knöcherne Areale wurden mittels Farbwürfel-Technik (3 x 3 Pixel) definiert, nachdem eine Standardisierung gegen den normalen corticalen Knochen außerhalb des Defektes vorgenommen worden war. Die vormaligen Defektgrenzen wurden digital markiert und das ehemalige Defektareal (area of interest = AOI) auf Intensität der Blaufärbung analysiert. Es wurden vier unterschiedliche Messungen vorgenommen:

1. Absolute Knochenmasse in der AOI
2. Mittlere Lichtintensität – die Messung der Intensität der Färbung ermöglicht dabei Rückschlüsse auf die Qualität des neugebildeten Knochens.
3. Masse mineralisierten Gewebes im Verhältnis zur Defektgröße in Prozent
4. IOD (integrated optical density), entspricht der mittleren optischen Lichtintensität pro gemessener Fläche

Als AOIs wurden folgende analysierte Zonen bestimmt:

1. Das gesamte Areal vom distalen bis zum proximalen Schraubenloch
2. Knochenneubildung entlang der entfernten DCP-Platte
3. Knochenneubildung der der entfernten DCP-Platte gegenüberliegenden Corticalis
4. Summe der Defektränder

Die Gesamtmasse der Mineralisation im Defektbereich war in der Verumgruppe, die mit Ad-TGF-beta behandelt worden war mehr als doppelt so hoch als in der

Kontrollgruppe ($19,5 \pm 10,7 \text{ mm}^2$ versus $9,04 \pm 4,3 \text{ mm}^2$), jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Noch deutlicher waren die Unterschiede unter Berücksichtigung der Fläche und der Lichtintensität (IOD) ($1754,0 \pm 906,0 \text{ mm}^2$ versus $557,7 \pm 138,0 \text{ mm}^2$). Auch hierbei war der Unterschied im t-Test für unverbundene Stichproben jedoch nicht signifikant, was sich durch die große Streuung bei geringen Fallzahlen erklärt.

Die Ergebnisse deuten jedoch dennoch darauf hin, daß TGF-beta, auf zellulärer Ebene produziert und exprimiert, einen positiven Einfluß auf die Mineralisation und Ossifikation nach Defektfrakturen hat. Durch die Nutzung der Technik des Gentransfers mit nachfolgender Expression des Wachstumsfaktors, die, wie in den Vorversuchen beschrieben ein überwiegend lokales Verfahren darstellt, könnten möglicherweise insbesondere die bekannten Nebenwirkungen einer systemischen TGF-beta Applikation vermieden werden.

Patentansprüche

1. Verwendung von Vektoren wie Adenoviren und/oder Adeno-assoziierten Viren und/oder Retroviren und oder Herpes-Simplex-Viren und/oder Liposomen und/oder Plasmiden als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen, als Arzneimittel wirkenden Proteinen auf zellulärem Niveau zur genetischen Behandlung von Knochenpathologien.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Adenoviren um adenovirale Vektoren handelt.
3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Adeno-assoziierten Viren um ein Adeno-assoziierte virale Vektoren handelt.
4. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Retroviren um retrovirale Vektoren handelt.
5. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Liposomen um liposomale Vektoren handelt, die die genetische Information für Wachstumsfaktoren oder Zytokine, bzw. deren Inhibitoren enthalten.
6. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Plasmiden um solche handelt, die die genetische Information für Wachstumsfaktoren oder Zytokine, bzw. deren Inhibitoren enthalten
7. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den therapeutischen Proteinen um Wachstumshormone, Zytokine oder Zytokininhibitoren handelt.

8. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zu stimulierenden Säugerzellen um tierische oder menschliche Zellen handelt, insbesondere Knochenzellen, Knochenmarkszellen, Bindegewebszellen und/oder Muskelzellen.
9. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektoren, die zur Produktion der Arzneimittel durch die transfizierten Zellen führen, parenteral appliziert werden.
10. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektoren, die zur Produktion der Arzneimittel durch die transfizierten Zellen führen, intraossär appliziert werden.
11. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektoren, die zur Produktion der Arzneimittel durch die transfizierten Zellen führen, lokal an den Ort der Knochenpathologie appliziert werden.
12. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Behandlung Säugerzellen dem Körper entnommen, dann *in-vitro* mittels der vorgenannten Vektoren transfiziert, in einem geeigneten Medium kultiviert und reimplantiert werden, um dann am Ort der Knochenpathologie, die als Arzneimittel wirksamen therapeutischen Proteine nach genetischer Manipulation der Zielzellen zu produzieren.
13. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Knochenpathologien um Osteoporose, lokalen oder systemischen Knochenmasseverlust, Knochensubstanzverlust oder Knochenstrukturstörungen, Knochenbrüche mit Knochensubstanzverlust, Defektfrakturen, oder Pseudarthrosen, Knochendefektzustände nach Operationen, Morbus Sudek, Knochensubstanzverlust bei Endoprothesenlockerungen, periartikuläre Osteolysen bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und/oder Osteonekrosen handelt.

14. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Knochenpathologie auch das Einheilen von Transplantaten, insbesondere ligamentärer, knöcherner oder tendinöser Transplantate, z.B. in der Knie- und Schulterchirurgie, einschließt.
15. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 – 14, dadurch gekennzeichnet, daß zur Verbesserung des Knochenaufbaus die genetische Information (cDNA) der therapeutischen Proteine BMP 2 - 7 und/oder FGFs und/oder IGFs und/oder PDGFs und/oder VEGF und/oder TGF- β verwandt wird oder die cDNA von Zytokinen oder Zytokininhibitoren, z.B. hIL-1Ra oder TNF- α -Inhibitoren.
16. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 – 14, dadurch gekennzeichnet, daß zur Reduktion des Knochenabbaus die genetische Information (cDNA) zur Bildung von Zytokininhibitoren, z. B. hIL-1Ra und sTNF α R und Interleukin-6 Inhibitoren oder resorptionshemmende Zytokine wie Interleukin-10, eingesetzt werden.
17. Verfahren zur Behandlung von Knochenpathologien unter Verwendung von Vektoren wie Adenoviren und/oder Adeno-assoziierten Viren und/oder Retroviren und/oder Herpes-Simplex-Viren und/oder Liposomen und/oder Plasmiden als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen Proteinen auf zellulärem Niveau gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche 1 bis 16.

Fig. 1

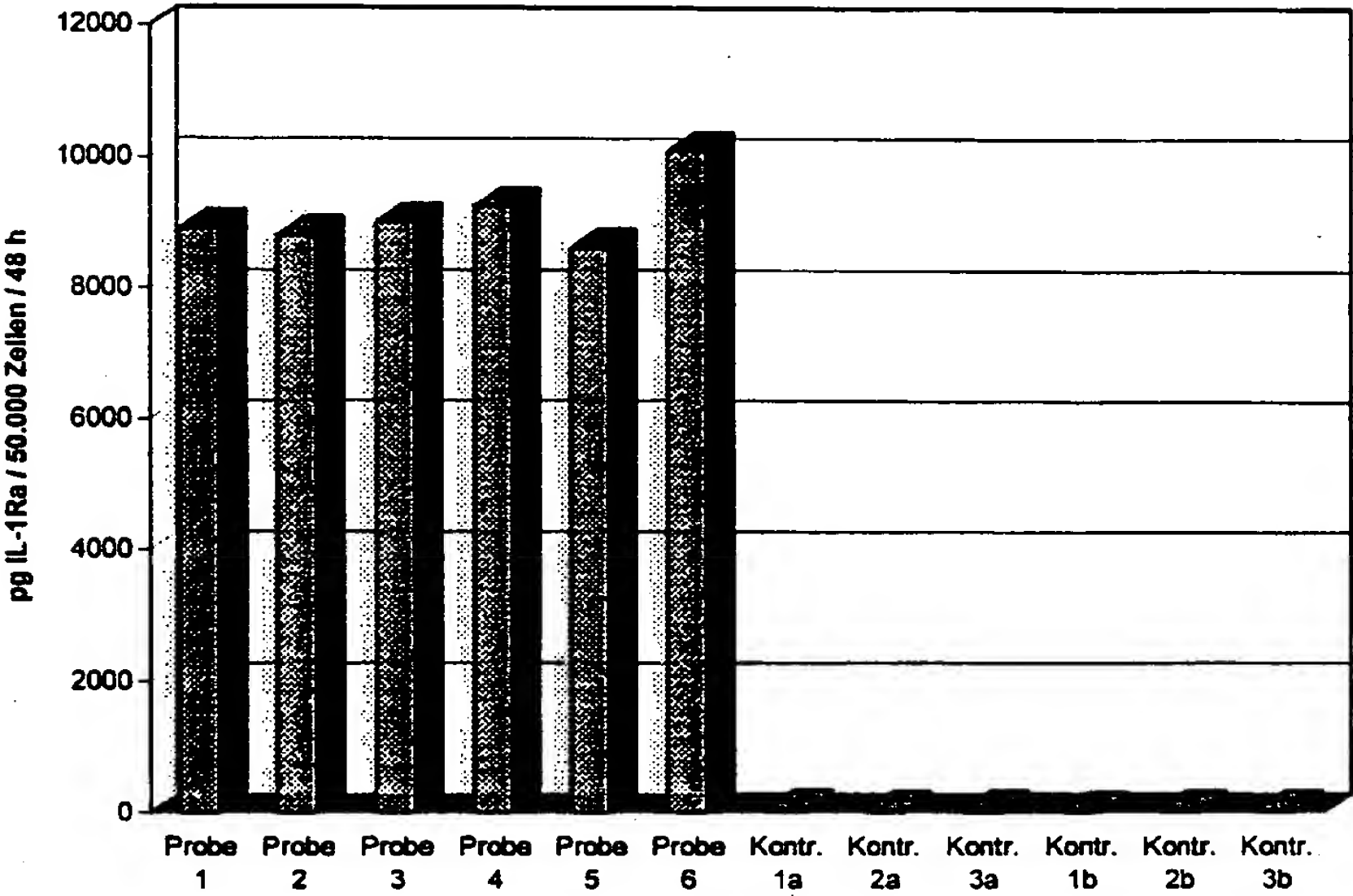


Fig. 2

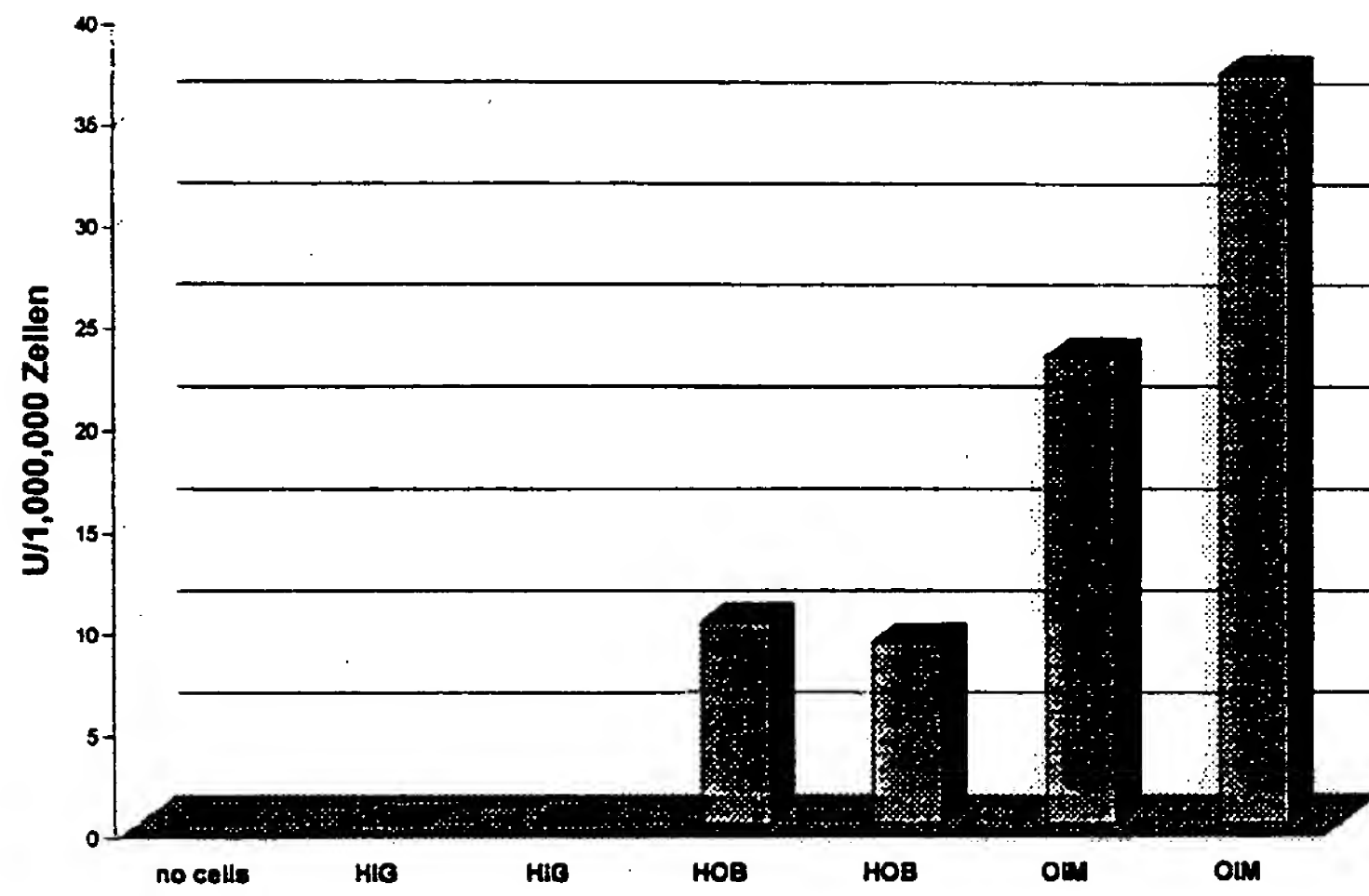


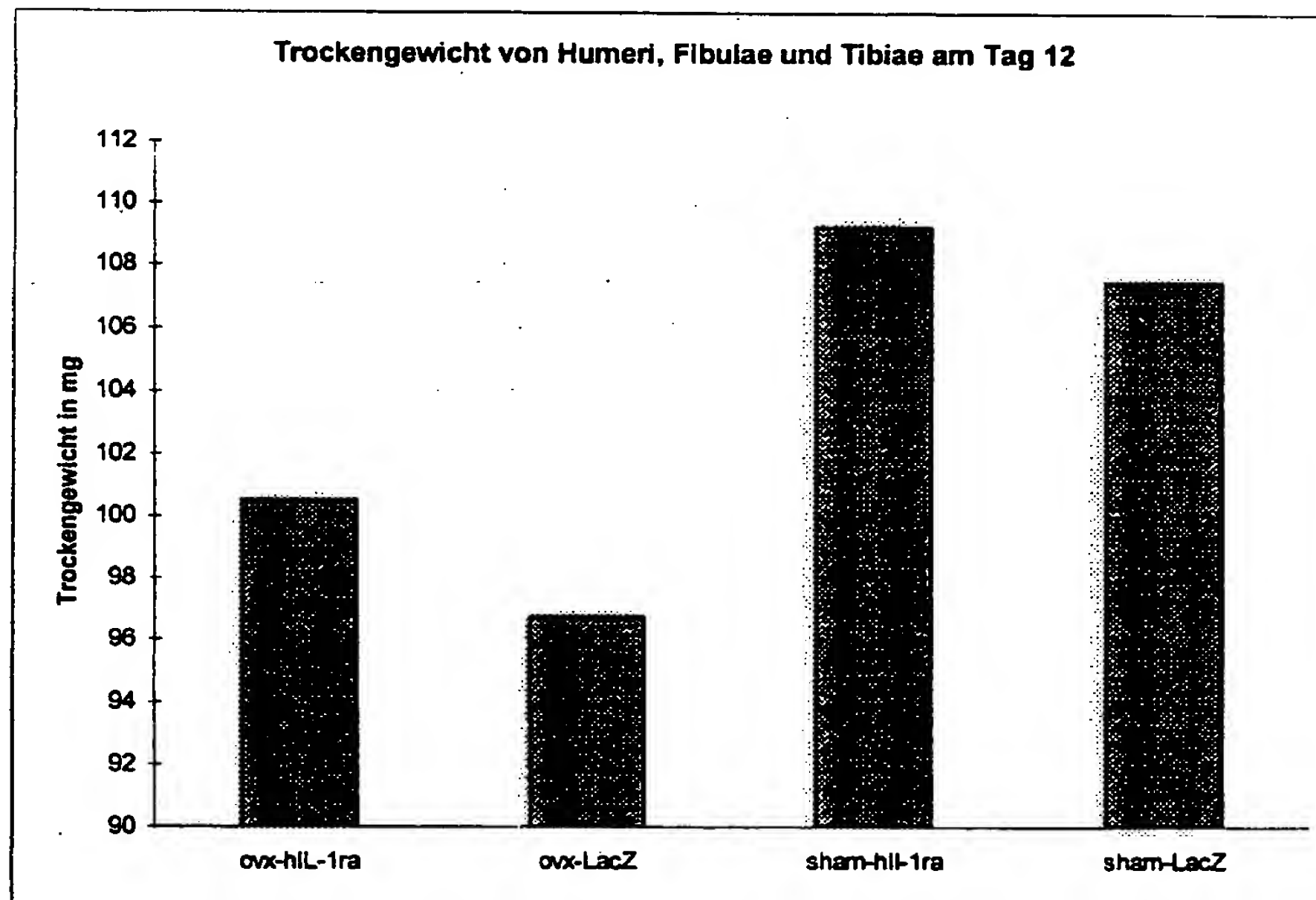
Fig. 3

Fig. 4

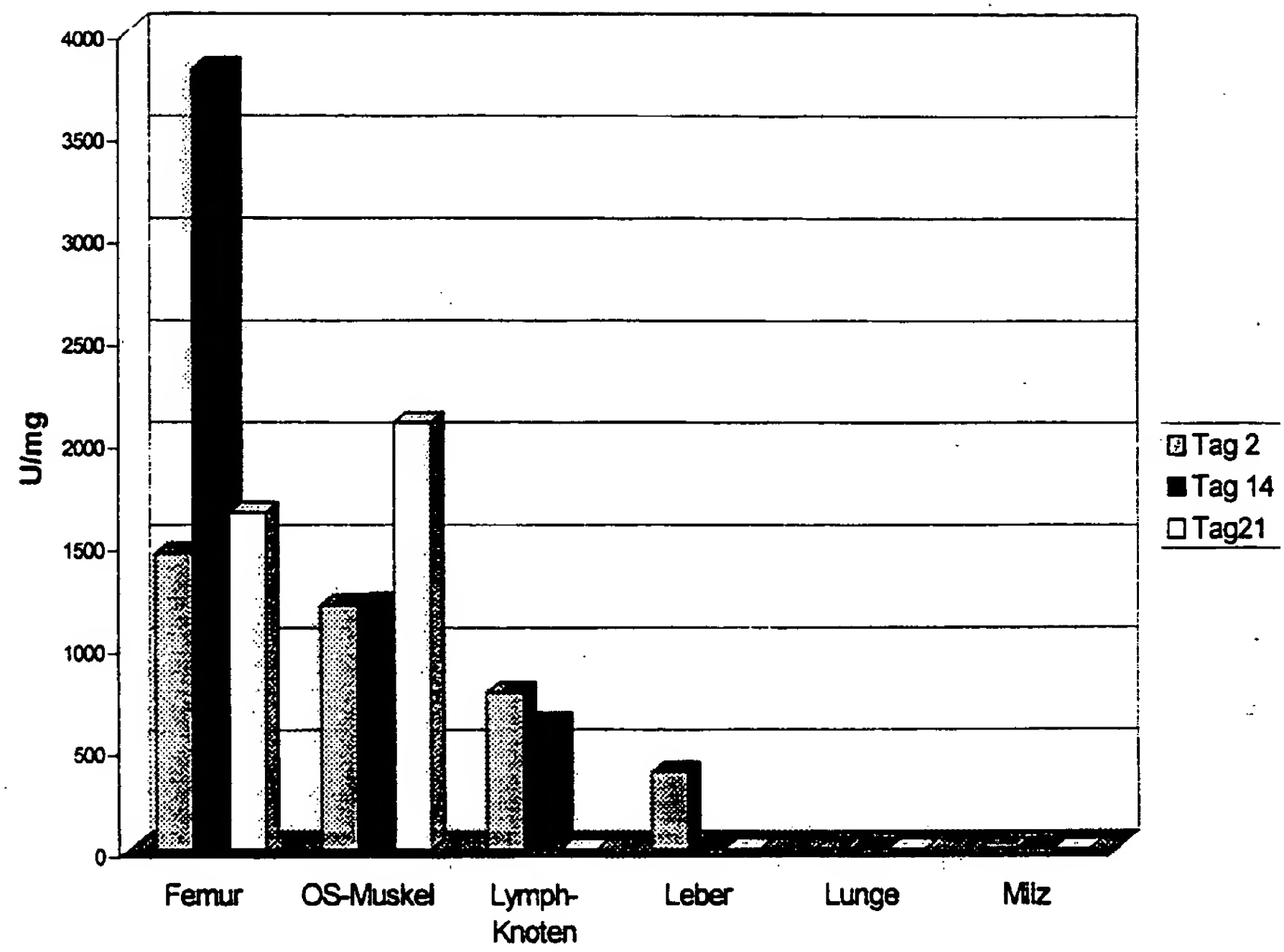


Fig. 5

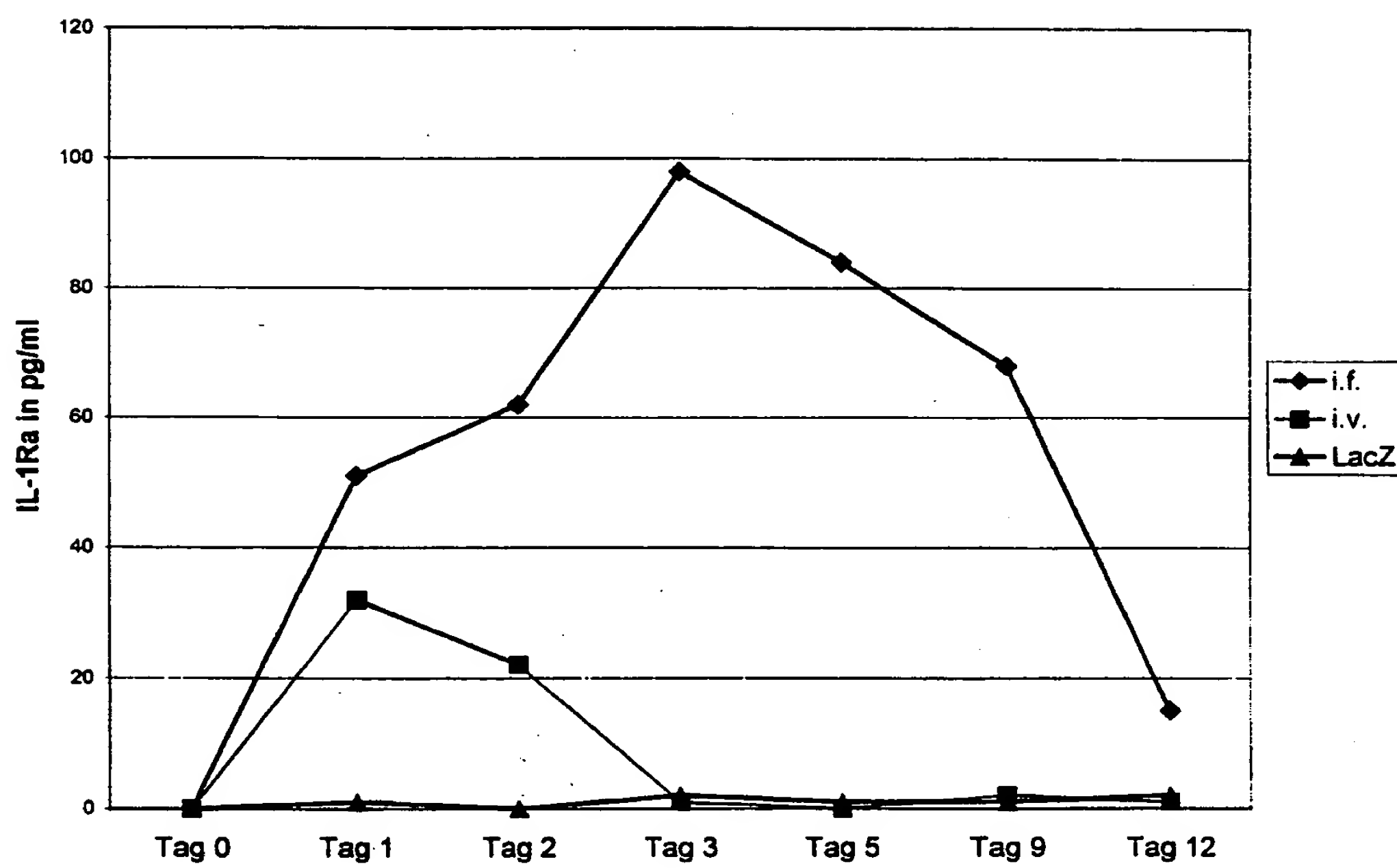


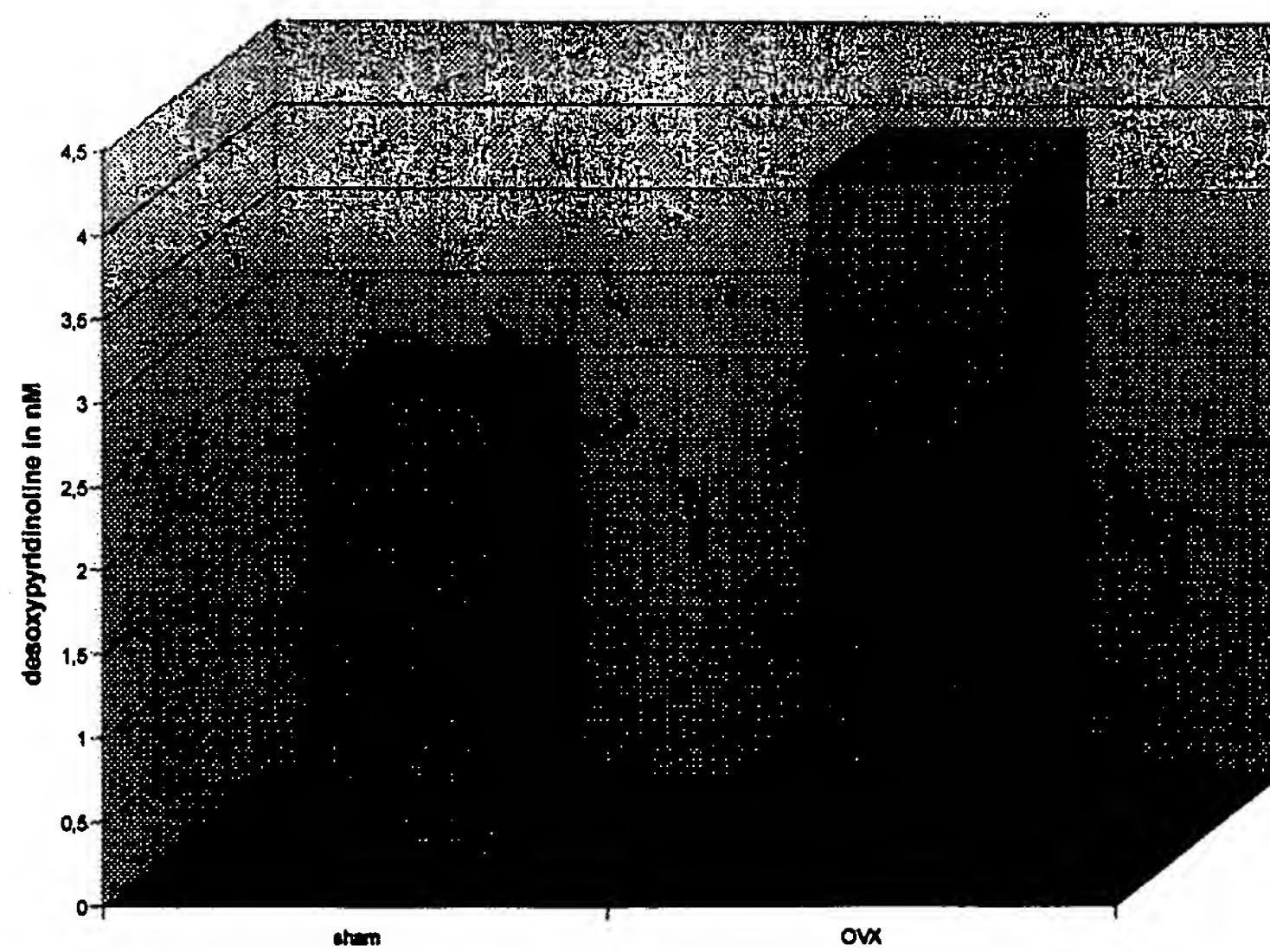
Fig. 6

Fig. 7

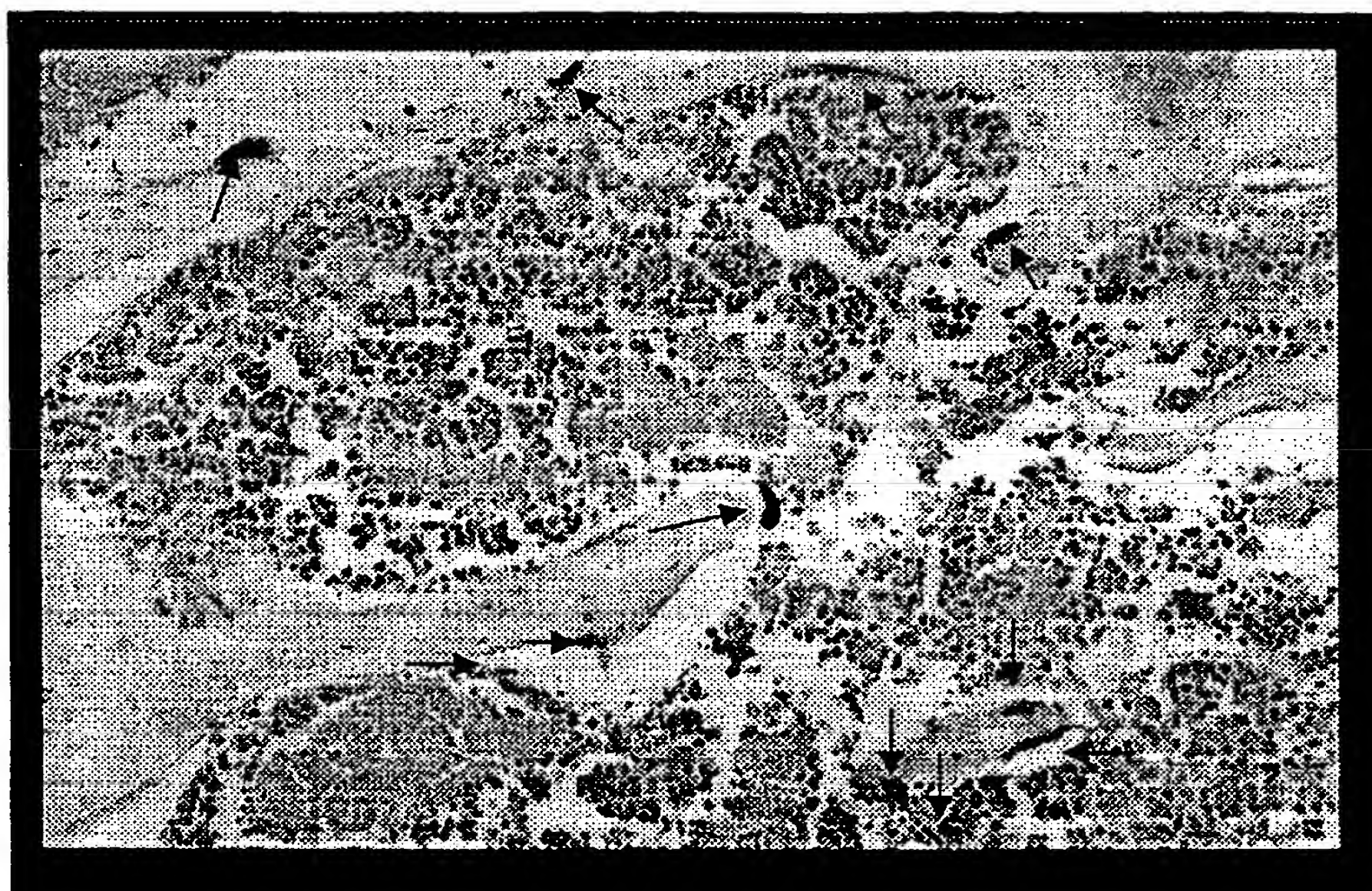


Fig. 8

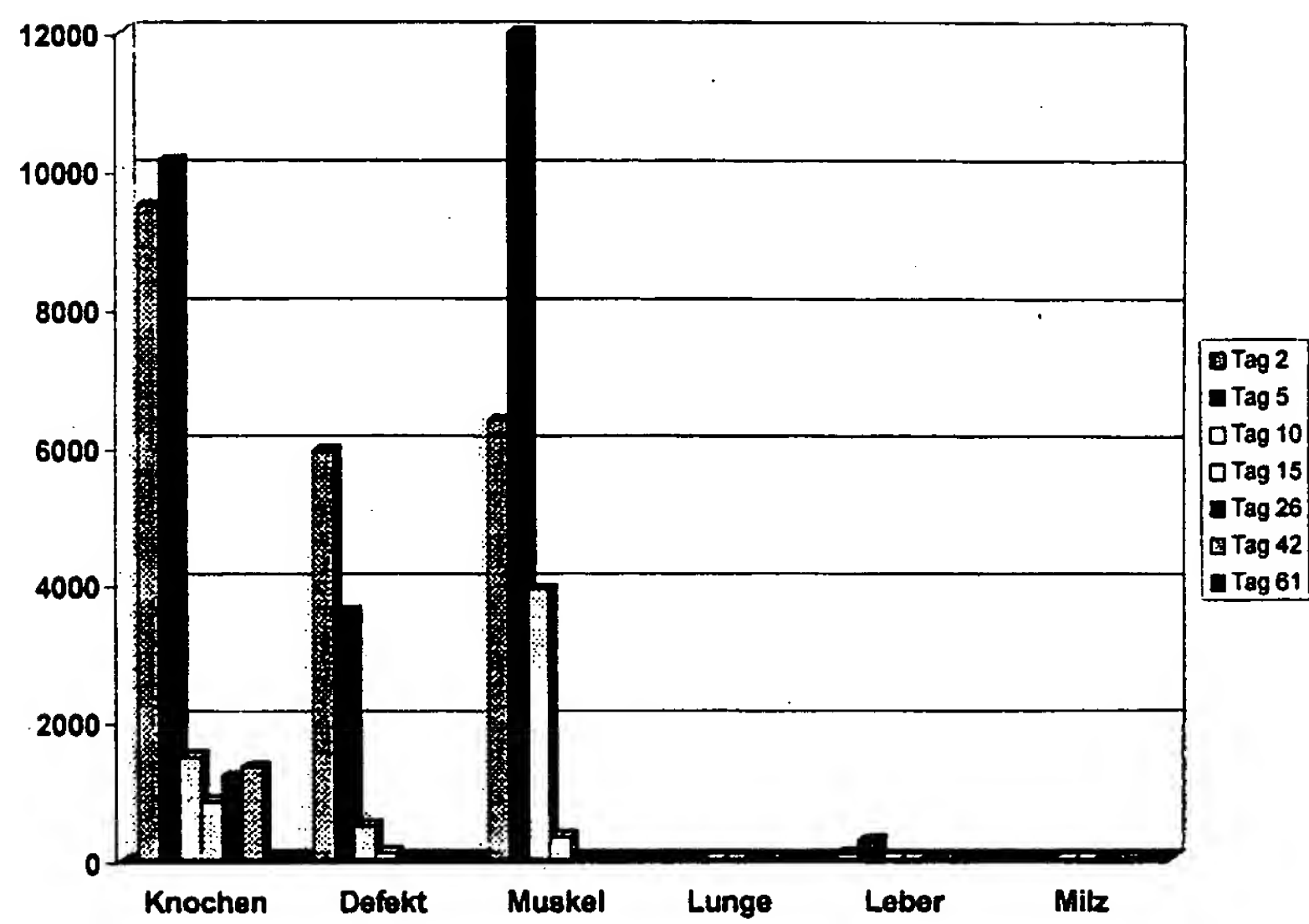


Fig. 9



Fig. 10

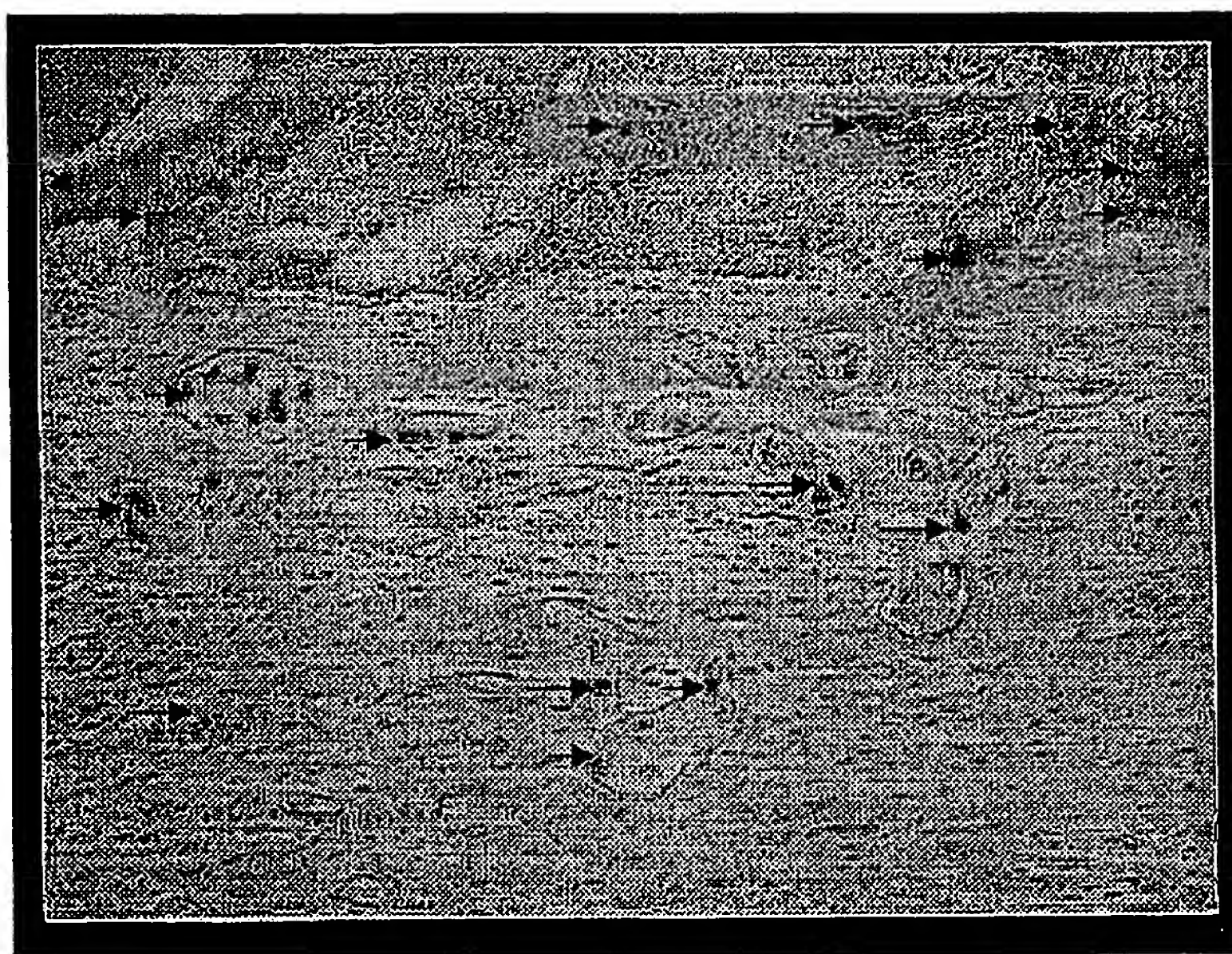
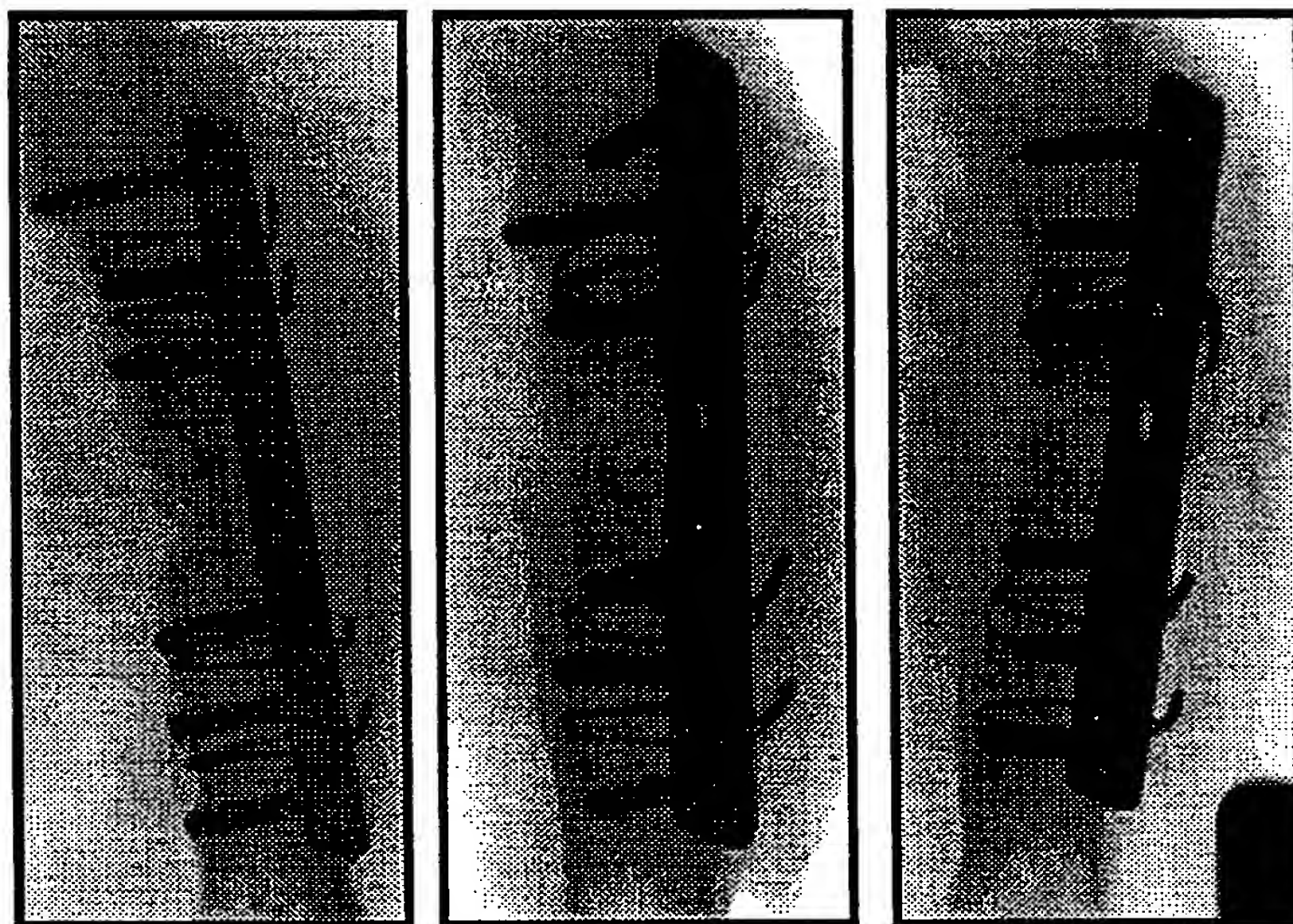


Fig. 11



A

B

C

Fig. 12

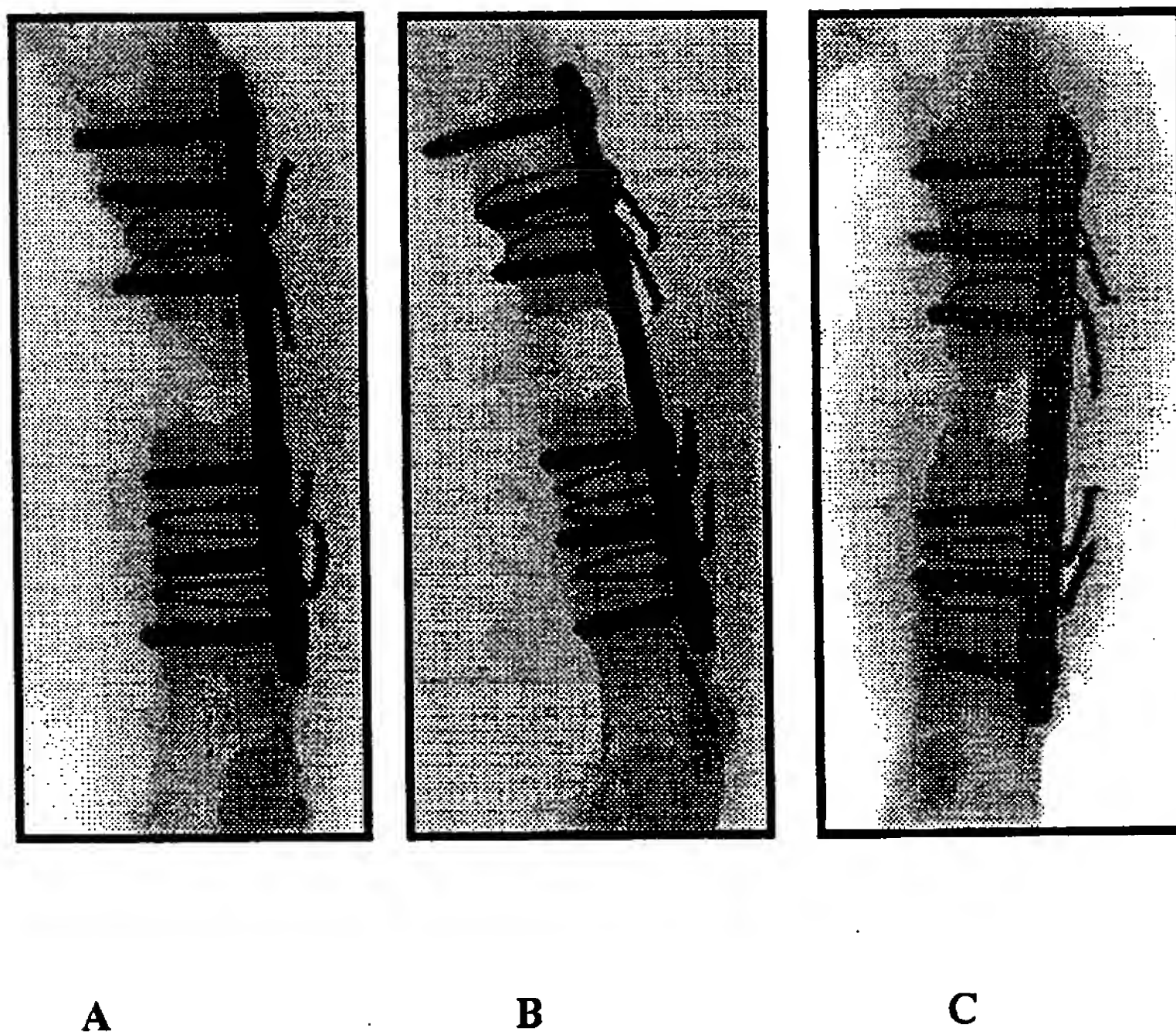
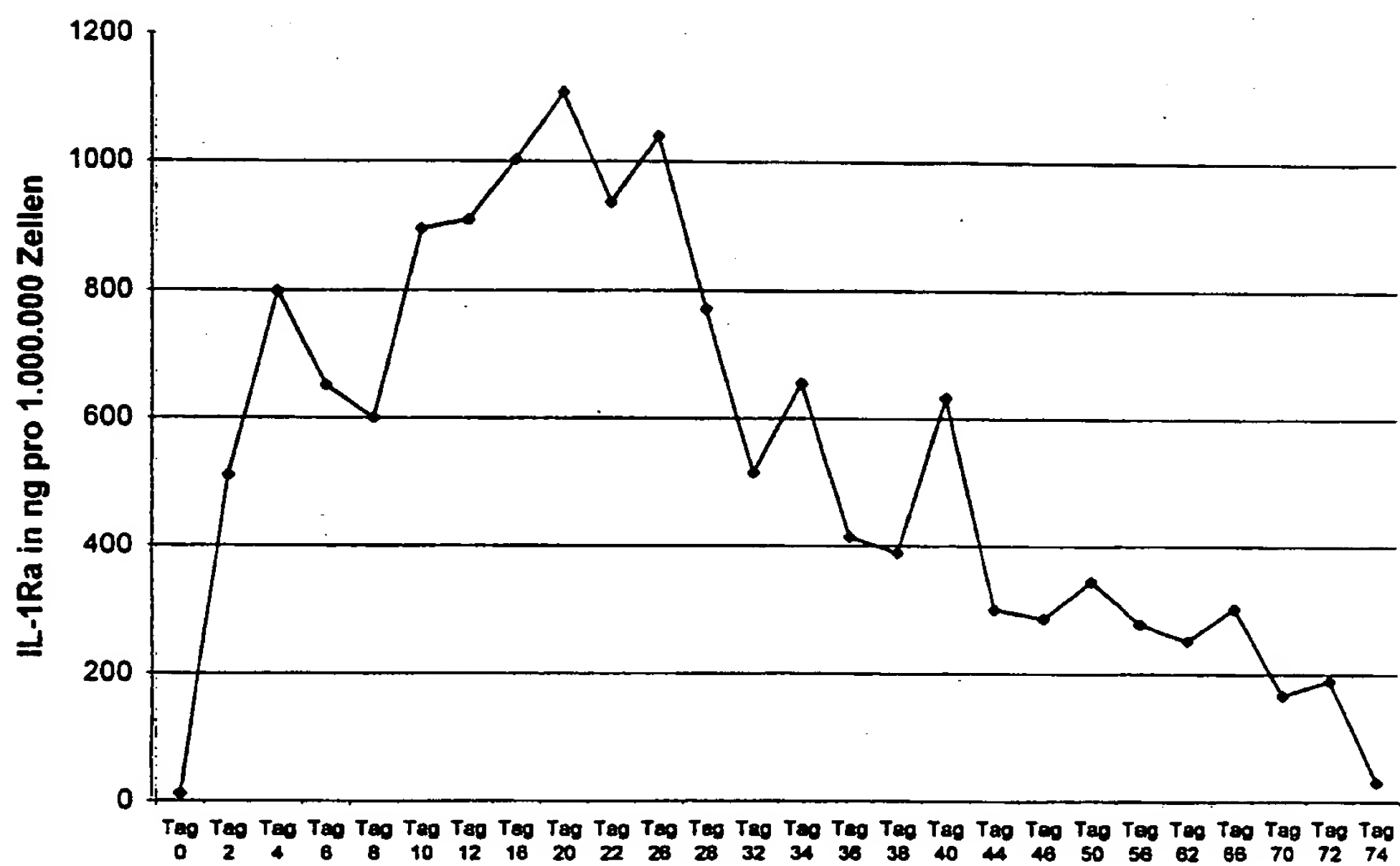


Fig. 13



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 48/00</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/21589</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)</p>								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06849</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">197 47 718.6</td> <td style="width: 33%;">29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td style="width: 33%;">DE</td> </tr> <tr> <td>197 47 719.4</td> <td>29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: BALTZER, Axel, Wilhelm, August [DE/DE]; Am Strickmorgen 12, D-41464 Neuss (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LATTERMANN, Christian [DE/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). WHALEN, Janey, Desales [US/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). ROBBINS, Paul, David [US/US]; 191 Main Entrance Drive, Pittsburgh, PA 15228 (US). EVANS, Christopher, Howard [GB/US]; 111 Maple Terrace, Pittsburgh, PA 15211 (US).</p> <p>(74) Anwalt: SIECKMANN, Ralf; Schumannstrasse 97-99, D-40237 Düsseldorf (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 14. Oktober 1999 (14.10.99)</p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06849</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">197 47 718.6</td> <td style="width: 33%;">29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td style="width: 33%;">DE</td> </tr> <tr> <td>197 47 719.4</td> <td>29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: BALTZER, Axel, Wilhelm, August [DE/DE]; Am Strickmorgen 12, D-41464 Neuss (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LATTERMANN, Christian [DE/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). WHALEN, Janey, Desales [US/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). ROBBINS, Paul, David [US/US]; 191 Main Entrance Drive, Pittsburgh, PA 15228 (US). EVANS, Christopher, Howard [GB/US]; 111 Maple Terrace, Pittsburgh, PA 15211 (US).</p> <p>(74) Anwalt: SIECKMANN, Ralf; Schumannstrasse 97-99, D-40237 Düsseldorf (DE).</p>	197 47 718.6	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE	197 47 719.4	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 14. Oktober 1999 (14.10.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06849</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">197 47 718.6</td> <td style="width: 33%;">29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td style="width: 33%;">DE</td> </tr> <tr> <td>197 47 719.4</td> <td>29. Oktober 1997 (29.10.97)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: BALTZER, Axel, Wilhelm, August [DE/DE]; Am Strickmorgen 12, D-41464 Neuss (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LATTERMANN, Christian [DE/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). WHALEN, Janey, Desales [US/US]; 1416 Macon Avenue, Pittsburgh, PA 15206 (US). ROBBINS, Paul, David [US/US]; 191 Main Entrance Drive, Pittsburgh, PA 15228 (US). EVANS, Christopher, Howard [GB/US]; 111 Maple Terrace, Pittsburgh, PA 15211 (US).</p> <p>(74) Anwalt: SIECKMANN, Ralf; Schumannstrasse 97-99, D-40237 Düsseldorf (DE).</p>	197 47 718.6	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE	197 47 719.4	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 14. Oktober 1999 (14.10.99)</p>			
197 47 718.6	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE								
197 47 719.4	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE								
<p>(54) Title: USE OF VECTORS SUCH AS ADENOVIRUSES AND/OR ADENO ASSOCIATED VIRUSES AND/OR RETROVIRUSES AND/OR HERPES SIMPLEX VIRUSES AND/OR LIPOSOMES AND/OR PLASMIDS AS A VEHICLE FOR GENETIC INFORMATION ENABLING MAMMAL CELLS TO PRODUCE AGENTS FOR THE TREATMENT OF BONE PATHOLOGIES</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON VEKTOREN WIE ADENOVIREN UND/ODER ADENO-ASSOZIIERTEN VIREN UND/ODER RETROVIREN UND/ODER HERPES-SIMPLEX-VIREN UND/ODER LIPOSOMEN UND/ODER PLASMIDEN ALS VEHIKEL FÜR GENETISCHE INFORMATION ZUR BEFÄHIGUNG VON SÄUGETIERZELLEN MITTEL, ZUR BEHANDLUNG VON KNOCHENPATHOLOGIEEN ZU PRODUZIEREN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Disclosed is the use of vectors such as adenoviruses and/or adeno associated viruses and/or retroviruses and/or Herpes Simplex viruses and/or liposomes and/or plasmids as agents which stimulate mammal cells in order to produce therapeutic proteins that act as medicaments on a cellular level for the genetic treatment of bone pathologies.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Offenbart wird die Verwendung von Vektoren wie Adenoviren und/oder Adeno-assoziierten Viren und/oder Retroviren und/oder Herpes-Simplex-Viren und/oder Liposomen und/oder Plasmiden als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen, als Arzneimittel wirkenden Proteinen auf zellulärem Niveau zur genetischen Behandlung von Knochenpathologien.</p>										

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06849

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K 48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EVANS, C. H. ET AL: "Possible Orthopaedic Applications of Gene Therapy." JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY AMERICAN VOLUME, (1995) VOL. 77, NO. 7, PP. 1103-1114. ISSN: 0021-9355., XP002101321 the whole document	1-17
X	WO 97 22623 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 26 June 1997 (26.06.97) Page 2, paragraph 4 - page 4, paragraph 4 Page 21, paragraph 4 - page 24, paragraph 1 Page 35 - page 37; example 3	1-14, 17
X	WO 96 23001 A (DEDHAR SHOUKAT :ST ARNAUD RENE (CA)): 1 August 1996 (01.08.96) Page 3, line 25 - page 5, line 20 Page 29, line 11 - page 38, line 4 -/--	1-6, 8-14, 17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 July 1999 (27.07.99)

Date of mailing of the international search report

27 August 1999 (27.08.99)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06849

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARAGI V M ET AL: "Transplantation of transduced chondrocytes protects articular cartilage from interleukin 1-induced extracellular matrix degradation." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1995 NOV) 96 (5) 2454-60. JOURNAL CODE: HS7. ISSN: 0021-9738., XP002101322 United States Page 2454 Abstract ---	1-17
X	DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US PELLETIER ET AL: "In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin - 1 receptor antagonist using gene therapy" retrieved from STN Database accession no. 97325898 XP002110336 Abstract & ARTHRITIS AND RHEUMATISM, (1997 JUN) 40 (6) 1012-9, ---	1-17
A	SCHWARZ, Y. A. (1) ET AL: "IL-1 receptor antagonist (IRAP) inhibits IL-8 production in A549 cells infected with a replication deficient recombinant adenovirus." FASEB JOURNAL, (1994) VOL. 8, NO. 4-5, PP. A136. MEETING INFO.: EXPERIMENTAL BIOLOGY 94, PARTS I AND II ANAHEIM, CALIFORNIA, USA APRIL 24-28, 1994 ISSN: 0892-6638., XP002101323 see abstract 789 ---	7,15,16
X	KANG R ET AL: "Gene therapy for arthritis: principles and clinical practice." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, (1997 MAY) 25 (2) 533-7. REF: 37 JOURNAL CODE: E48. ISSN: 0300-5127., XP002101324 ENGLAND: United Kingdom The whole document ---	1-17
A	WO 95 27518 A (PLASMA BIOTAL LTD ;UNIV ABERDEEN (GB); MURALI SRIMATHI RAJAGOPALAN) 19 October 1995 (19.10.95) Page 3, line 21 - page 4, line 5 -/--	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06849

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US KIMBLE ET AL: "Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats" retrieved from STN Database accession no. 94237958 XP002110337 Abstract & JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1994 MAY) 93 (5) 1959-67,</p>	
A	<p>WO 91 18047 A (GENENTECH INC) 28 November 1991 (28.11.91) Page 3, line 16 - page 4, line 22</p>	15
P,X	<p>WO 98 13383 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;PERRICAUDET MICHEL (FR); ANGELETTI P IST R) 2 April 1998 (02.04.98) Page 1, line 7 - page 3, line 23</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/06849

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims Nos. 1-17 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

1. Claims Nos. 1, 7-17 (in part); 2 (in full)

Use of vectors as agents which stimulate mammal cells in order to produce therapeutic proteins acting as medicaments on a cellular level for the genetic treatment of bone pathologies and, if the vector is an adenovirus, related methods for treating bone pathologies; related methods for treating bone pathologies

2. Claims Nos. 1, 7-17 (in part); 3 (in full)

Use of vectors as agents which stimulate mammal cells in order to produce therapeutic proteins acting as medicaments on a cellular level for the genetic treatment of bone pathologies and, if the vector is an adeno-associated virus, related methods for treating bone pathologies

3. Claims Nos. 1, 7-17 (in part); 5 (in full)

Use of vectors as agents which stimulate mammal cells in order to produce therapeutic proteins acting as medicaments on a cellular level for the genetic treatment of bone pathologies and, if the vector is a retrovirus, related methods for treating bone pathologies

4. Claims Nos. 1, 7-17 (in part), 4 (in full)

Use of vectors as agents which stimulate mammal cells in order to produce therapeutic proteins acting as medicaments on a cellular level for the genetic treatment of bone pathologies and, if the vector is a liposome, related methods for treating bone pathologies

5. Claims Nos 1, 7-17 (in part), 6 (in full)

Use of vectors as agents which stimulate mammal cells in order to produce therapeutic proteins acting as medicaments on a cellular level for the genetic treatment of bone pathologies and, if the vector is a plasmid, related methods for treating bone pathologies

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9722623 A	26-06-1997	AU 4692896 A EP 0874864 A	14-07-1997 04-11-1998
WO 9623001 A	01-08-1996	US 5854202 A AU 3920395 A WO 9905172 A EP 0807121 A	29-12-1998 14-08-1996 04-02-1999 19-11-1997
WO 9527518 A	19-10-1995	AU 2218395 A DE 19581923 T GB 2301531 A, B US 5824087 A ZA 9502880 A	30-10-1995 12-02-1998 11-12-1996 20-10-1998 21-12-1995
WO 9118047 A	28-11-1991	US 5168050 A AT 114163 T CA 2082052 A DE 69105205 D DE 69105205 T DK 531448 T EP 0531448 A ES 2067238 T GR 3014924 T	01-12-1992 15-12-1994 25-11-1991 22-12-1994 18-05-1995 01-05-1995 17-03-1993 16-03-1995 31-05-1995
WO 9813383 A	02-04-1998	IT RM960650 A AU 4636897 A	24-03-1998 17-04-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06849

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 A61K48/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EVANS, C. H. ET AL: "Possible Orthopaedic Applications of Gene Therapy." JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY AMERICAN VOLUME, (1995) VOL. 77, NO. 7, PP. 1103-1114. ISSN: 0021-9355., XP002101321 das ganze Dokument ---	1-17
X	WO 97 22623 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 26. Juni 1997 (1997-06-26) Seite 2, Absatz 4 - Seite 4, Absatz 4 Seite 21, Absatz 4 - Seite 24, Absatz 1 Seite 35 - Seite 37; Beispiel 3 ---	1-14, 17
X	WO 96 23001 A (DEDHAR SHOUKAT ; ST ARNAUD RENE (CA)) 1. August 1996 (1996-08-01) Seite 3, Zeile 25 - Seite 5, Zeile 20 Seite 29, Zeile 11 - Seite 38, Zeile 4 --- -/--	1-6, 8-14, 17
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 27. Juli 1999		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 27.08.99
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Bevollmächtigter Bediensteter Sitch, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>BARAGI V M ET AL: "Transplantation of transduced chondrocytes protects articular cartilage from interleukin 1-induced extracellular matrix degradation." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1995 NOV) 96 (5) 2454-60. JOURNAL CODE: HS7. ISSN: 0021-9738., XP002101322 United States Seite 2454 Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1-17
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US PELLETIER ET AL: "In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin - 1 receptor antagonist using gene therapy" retrieved from STN Database accession no. 97325898 XP002110336 Zusammenfassung & ARTHRITIS AND RHEUMATISM, (1997 JUN) 40 (6) 1012-9,</p> <p>---</p>	1-17
A	<p>SCHWARZ, Y. A. (1) ET AL: "IL-1 receptor antagonist (IRAP) inhibits IL-8 production in A549 cells infected with a replication deficient recombinant adenovirus." FASEB JOURNAL, (1994) VOL. 8, NO. 4-5, PP. A136. MEETING INFO.: EXPERIMENTAL BIOLOGY 94, PARTS I AND II ANAHEIM, CALIFORNIA, USA APRIL 24-28, 1994 ISSN: 0892-6638., XP002101323 siehe Zusammenfassung 789</p> <p>---</p>	7,15,16
X	<p>KANG R ET AL: "Gene therapy for arthritis: principles and clinical practice." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, (1997 MAY) 25 (2) 533-7. REF: 37 JOURNAL CODE: E48. ISSN: 0300-5127., XP002101324 ENGLAND: United Kingdom das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-17
A	<p>WO 95 27518 A (PLASMA BIOTAL LTD ;UNIV ABERDEEN (GB); MURALI SRIMATHI RAJAGOPALAN) 19. Oktober 1995 (1995-10-19) Seite 3, Zeile 21 - Seite 4, Zeile 5</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	15

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US KIMBLE ET AL: "Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats" retrieved from STN Database accession no. 94237958 XP002110337 Zusammenfassung & JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1994 MAY) 93 (5) 1959-67, -----	
A	WO 91 18047 A (GENENTECH INC) 28. November 1991 (1991-11-28) Seite 3, Zeile 16 - Seite 4, Zeile 22 -----	15
P,X	WO 98 13383 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;PERRICAUDET MICHEL (FR); ANGELETTI P IST R) 2. April 1998 (1998-04-02) Seite 1, Zeile 7 - Seite 3, Zeile 23 -----	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. ationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06849

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 1-17 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1, 7-17 (teilweise); 2 (vollständig)

Verwendung von Vektoren als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen, als Arzneimittel wirkenden Proteinen auf zellulärem Niveau zur genetischen Behandlung von Knochenpathologien, und wenn das Vektor ein Adenovirus ist; damit verbundene Verfahren zur Behandlung von Knochenpathologien

2. Ansprüche: 1, 7-17 (teilweise); 3 (vollständig)

Verwendung von Vektoren als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen, als Arzneimittel wirkenden Proteinen auf zellulärem Niveau zur genetischen Behandlung von Knochenpathologien, und wenn das Vektor ein Adeno-assoziierte Virus ist; damit verbundene Verfahren zur Behandlung von Knochenpathologien

3. Ansprüche: 1, 7-17 (teilweise); 4 (vollständig)

Verwendung von Vektoren als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen, als Arzneimittel wirkenden Proteinen auf zellulärem Niveau zur genetischen Behandlung von Knochenpathologien, und wenn das Vektor ein Retrovirus ist; damit verbundene Verfahren zur Behandlung von Knochenpathologien

4. Ansprüche: 1, 7-17 (teilweise); 5 (vollständig)

Verwendung von Vektoren als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen, als Arzneimittel wirkenden Proteinen auf zellulärem Niveau zur genetischen Behandlung von Knochenpathologien, und wenn das Vektor ein Liposom ist; damit verbundene Verfahren zur Behandlung von Knochenpathologien

5. Ansprüche: 1, 7-17 (teilweise); 6 (vollständig)

Verwendung von Vektoren als säugerzellenstimulierendes Mittel zur Herstellung von therapeutischen, als Arzneimittel wirkenden Proteinen auf zellulärem Niveau zur genetischen Behandlung von Knochenpathologien, und wenn das Vektor ein Plasmid ist; damit verbundene Verfahren zur Behandlung von Knochenpathologien

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Paténtfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06849

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9722623 A	26-06-1997	AU 4692896 A EP 0874864 A	14-07-1997 04-11-1998
WO 9623001 A	01-08-1996	US 5854202 A AU 3920395 A WO 9905172 A EP 0807121 A	29-12-1998 14-08-1996 04-02-1999 19-11-1997
WO 9527518 A	19-10-1995	AU 2218395 A DE 19581923 T GB 2301531 A, B US 5824087 A ZA 9502880 A	30-10-1995 12-02-1998 11-12-1996 20-10-1998 21-12-1995
WO 9118047 A	28-11-1991	US 5168050 A AT 114163 T CA 2082052 A DE 69105205 D DE 69105205 T DK 531448 T EP 0531448 A ES 2067238 T GR 3014924 T	01-12-1992 15-12-1994 25-11-1991 22-12-1994 18-05-1995 01-05-1995 17-03-1993 16-03-1995 31-05-1995
WO 9813383 A	02-04-1998	IT RM960650 A AU 4636897 A	24-03-1998 17-04-1998